



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
MICROESTRUTURADOS CONTENDO CHALCONAS PARA O  
TRATAMENTO VIA ORAL DO DIABETES MELITO

CRISTIAN RAFAEL KLEEMANN

Florianópolis  
2012



Cristian Rafael Kleemann

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
MICROESTRUTURADOS CONTENDO CHALCONAS PARA O  
TRATAMENTO VIA ORAL DO DIABETES MELITO

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Angela  
Machado de Campos

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kleemann, Cristian Rafael  
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
MICROESTRUTURADOS CONTENDO CHALCONAS PARA O TRATAMENTO VIA  
ORAL DO DIABETES MELITO [dissertação] / Cristian Rafael  
Kleemann ; orientadora, Angela Machado de Campos -  
Florianópolis, SC, 2012.  
149 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Sistema de liberação de fármacos. 3.  
Micropartículas poliméricas. 4. Diabetes melito. 5.  
Atividade anti-hiperglicêmica. I. de Campos, Angela  
Machado . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Folhas das assinaturas



Este trabalho é dedicado à Angela  
Machado de Campos pelo carinho e  
confiança.





## AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pela vida e pela oportunidade de viver sempre novos desafios.

À minha orientadora Prof<sup>ra</sup>. Dra. Angela Machado de Campos, pela confiança, paciência e compreensão. Tua amizade e carinho foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti e seus orientados, e em especial à pós-doutoranda Luciana Tavares, pela síntese dos compostos.

À Prof<sup>ra</sup>. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela participação e amizade dispensados à mim durante todo meu trabalho.

Ao doutorando Allisson Castro, pela dedicação, motivação e paciência, mostrando alguns dos segredos e artimanhas do árduo trabalho com modelos animais.

A todos os professores e colaboradores do laboratório de Controle de Qualidade principalmente as mestrandas Manoela e Gabriela por estarem sempre disponíveis para discutir e contribuir com o meu trabalho.

Ao LCME/UFSC, especificamente ao Luciano, pelas análises no MEV. E ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos pelas colaborações, pela disponibilidade e pela prontidão em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Olávio e Marlene Kleemann, e aos meus irmãos Aislan e Natiele Kleemann, só vocês sabem o quanto este título é sinônimo de superação, garra e força de vontade. Palavras não conseguiriam expressar o quanto são fundamentais em minhas conquistas. Todas as vezes que puder não vou hesitar em dizer: “Pai, Mãe, vocês são a fórmula do meu sucesso Amo vocês!!”

Aos colegas e técnicos de laboratório do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Catarina. Especialmente a minha super colega e amiga Talitha pelos momentos de descontração e motivação na reta final deste trabalho.

Muito Obrigado!



## RESUMO

Chalconas sintéticas da série 6-quilonil chalcona (QC2 e QC10) são capazes de reduzir a glicemia de ratos hiperglicêmicos atuando em múltiplos alvos de ação. Com objetivo de melhorar o perfil biofarmacêutico e o potencial terapêutico destas chalconas, um estudo de formulação foi conduzido no sentido de otimizar um sistema microparticulado pela técnica de emulsificação o/a seguida de evaporação/extração do solvente. Este estudo foi baseado em um planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ , no qual foram avaliados os efeitos da concentração de surfactante, quantidade de chalcona QC2, volume de fase orgânica volume de fase externa e volume de fase de extração sobre rendimento, tamanho das partículas, polidispersão e eficiência de encapsulação (EE). O rendimento foi de cerca de 93 %. O tamanho de partícula variou entre 84,1 a 191,8  $\mu\text{m}$ , com uma baixa polidispersão. A EE variou entre 78,5 a 97,8 %, sendo influentes sobre este parâmetro a concentração de chalconas e polímero, bem como a utilização de extração para eliminação do solvente. A partir deste estudo foram estabelecidas as condições de obtenção de uma formulação otimizada com máxima EE e teor de chalcona. Em um segundo estudo de formulação foram desenvolvidos, a partir da formulação otimizada, micropartículas incluindo a chalcona QC10 e o polímero Eudragit® RS100 (PLGA/QC2 ou QC10 e Eudragit/QC2 ou QC10). O tamanho de partícula variou em função do tipo de polímero. As partículas apresentaram forma esférica e lisa, exceto o sistema PLGA/QC10, no qual foi evidenciado deposição de cristais na superfície. Na análise por TGA a chalcona QC10 apresentou maior estabilidade térmica em relação à QC2. Nas análises por CED apenas o sistema Eudragit/QC2 apresentou evento de fusão relativo à chalcona, sugerindo amorfização das chalconas encapsuladas nos demais sistemas. O perfil de liberação para PLGA/QC10 foi correlacionado à presença desta chalcona na superfície da partícula, liberando 80% da chalcona, enquanto que na formulação PLGA/QC2 não houve liberação. Os sistemas preparados com Eudragit apresentaram 95 % de liberação para QC10 e 78 % de liberação para a QC2 após 24 horas. A avaliação *in vivo* em modelos de ratos hiperglicêmicos demonstrou que o sistema Eudragit/QC10 (15 mg) possibilitou a redução da glicemia após a sobrecarga de glicose em relação ao grupo tratado com a mesma dose de chalcona QC10 não encapsulada.

**Palavras-chave:** micropartículas poliméricas, sistemas de liberação de fármacos, chalconas, atividade anti-hiperglicêmica, diabetes melito.



## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE SYSTEMS MICROSTRUCTURED CONTAINING CHALCONES FOR ORAL ADMINISTRATION FOR TREATMENT OF DIABETES MELLITUS

Synthetic chalcones of the 6-quinolyl chalcone (QC2 and QC10) series are able to reduce the glycemia in hyperglycemic rats acting on multiple targets. In order to improve the biopharmaceutical profile and the therapeutic potential of these chalcones, a preformulation study was conducted to optimize a microparticulate system developed using oil-in-water emulsion/solvent evaporation technique. This study was based on a fraction factorial design  $2^{5-1}$ , which evaluated the effect of the surfactant concentration, amount of chalcone QC2, organic phase volume, external phase volume and extraction phase volume on the yield, particle size, size distribution and encapsulation efficiency (EE). The yield was around 93 %. The particle size ranged from 84.1 to 191.8  $\mu\text{m}$ , with a narrow particles size distribution. EE was from 78.5 to 97.8 %, influenced by the chalcone and polymer concentration and the use of the extraction for solvent elimination. From this study were established the conditions to obtain an optimized formulation with maximum values of EE and QC2-loading. In a second formulation study were developed microparticles including the chalcone QC10 and Eudragit<sup>®</sup> RS100 polymer (PLGA/QC2 or QC10 and Eudragit/QC2 or QC10). The particle size were affected by polymer type, the microparticles were spherical and smooth, except the system PLGA/QC10 that presented free chalcone in the microparticles surface. The analysis of the chalcone QC10 by TGA showed a higher thermal stability compared to QC2. The release behavior of the PLGA/QC10 can be correlated with the chalcone presence in the microparticles surface, however the PLGA/QC2 formulation was not released. The systems prepared with Eudragit<sup>®</sup> showed 95 % and 78 % of the QC10 and QC2 were released after 24 hours, respectively. The *in vivo* evaluation in hyperglycemic rats demonstrated that the system Eudragit/QC10 (15 mg/kg) had a significantly major reduction of glycemia after the glucose administration, when compared to the group treated with free QC10 chalcone.

**Keywords:** microparticles polymeric, drug delivery system, chalcones, anti-hyperglycemic activity, diabetes mellitus.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo fundamental das chalconas (1,3-difenil-2-propenona).	34
Figura 2. Estrutura molecular das chalconas 6-quilonil chalcona e 6-quilonil-N-oxide-chalcona.	36
Figura 3. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o rendimento avaliando a interação dos fatores B e D, quantidade de chalcona $\times$ volume da fase aquosa.	62
Figura 4. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o rendimento avaliando a interação dos fatores C e D, volume de fase orgânica $\times$ volume de fase aquosa.	63
Figura 5. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o tamanho de partícula a partir dos fatores C e E volume de fase orgânica $\times$ fase de extração.	64
Figura 6. Gráfico de interação entre os fatores volume de fase orgânica e volume de fase aquosa (C e D) utilizados no preparo das micropartículas para a resposta Span (polidispersão).	65
Figura 7. Micrografia representativa dos sistemas microparticulados desenvolvidos no estudo de formulação.	65
Figura 8. Espectro de absorção no UV. Linha tracejada MCP de PLGA brancas, linha contínua solução de QC2 em diclorometano 5,0 $\mu\text{g/mL}$ .	67
Figura 9. Curva de calibração da chalcona QC2 em diclorometano por espectrofotometria UV.	67
Figura 10. Gráfico de interação entre os fatores B e C, quantidade de chalcona $\times$ volume de fase orgânica, para a avaliação da eficiência de encapsulação.	68
Figura 11. Gráfico tridimensional avaliando a interação entre os fatores quantidade de chalcona e volume de FO para a resposta teor de chalcona $\text{mg}/100\text{mg}$ de micropartículas.	69
Figura 12. Representação gráfica da desejabilidade entre montante de chalcona e volume de fase orgânica.	71
Figura 13. Estrutura química das chalconas QC2 e QC10.	88
Figura 14. Cromatogramas da especificidade do método por CLAE.	90
Figura 15. Micrografias obtidas por MEV (a) MCP brancas de Eudragit, (b) MCP brancas de PLGA, (c) Eudragit/QC2, (d) PLGA/QC2, (e) Eudragit/QC10 e (f) PLGA/QC10.	97

Figura 16. Curvas TG/ CED das chalconas QC2 (a) e QC10 (b), obtidas sob a razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ).....	100
Figura 17. Curvas de TG dos sistemas microparticulados contendo os polímeros Eudragit®RS100 e PLGA 503 obtidos a partir das chalconas QC2 (a) e QC10 (b). ....	101
Figura 18. Curvas de CED referentes à (A) chalcona QC2, suas misturas físicas e sistemas microparticulados e (B) chalcona QC10, suas misturas físicas e sistemas microparticulados. ....	103
Figura 19. Difrátogramas referentes à (A) chalcona QC2, suas misturas físicas e sistemas microparticulados e (B) chalcona QC10, suas misturas físicas e sistemas microparticulados. ....	104
Figura 20. Micrografias obtidas por MEV das micropartículas de PLGA QC2 (a) e PLGA QC10 (b), após ensaio de dissolução. ....	110
Figura 21. Perfis de liberação dos sistemas microparticulados Eudragit/QC2, Eudragit/QC10, PLGA/QC2 e PLGA/QC10. ....	111
Figura 22. Perfil para o controle hiperglicêmico após as duas cargas de glicose e controle euglicêmico avaliados em ratos machos Wistar.....	113
Figura 23. Efeito da chalcona QC2 nas concentrações 5 e 15 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. ....	116
Figura 24. Efeito da chalcona QC10 nas concentrações 5 e 15 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos.. ....	117
Figura 26. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit/QC2 e PLGA/QC2, grupo III, na concentração de 5 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos.. ....	118
Figura 27. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit/QC2 e PLGA/QC2, grupo IV, na concentração de 15 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos.. ....	119
Figura 28. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit QC10 e PLGA QC10, grupo V, na concentração de 5 (mg/kg) nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos.....	120
Figura 29. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit/QC10 e PLGA/QC10, grupo VI, na concentração de 15 (mg/kg) nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmico.....	121



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores e respectivos níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado ( $2^{5-1}$ ) para o estudo de formulação das micropartículas. ....	53
Tabela 2. Delineamento fatorial $2^{5-1}$ referente ao estudo de formulação para a obtenção das micropartículas.....	54
Tabela 3. Resultados obtidos no estudo de caracterização das micropartículas obtidas usando delineamento fatorial $2^{5-1}$ .....	58
Tabela 4. Termos do modelo significante, valores dos coeficientes de regressão e valores de $p$ para as respostas rendimento, tamanho de partícula, polidispersão, eficiência de encapsulação e teor de QC2.....	61
Tabela 5. Comparação entre valores preditos e obtidos experimentalmente no processo de otimização .....	71
Tabela 6. Avaliação do sistema otimizado com o aumento da concentração de chalcona para as respostas EE e teor .....	72
Tabela 7. Parâmetros dos métodos cromatográficos e programação de fase móvel para CLAE. Fase móvel: solvente A: Metanol ou solução metanólica de NaOH 0,1 N; solvente B: água ultrapura. ....	89
Tabela 8. Resultados obtidos na análise da linearidade para a chalcona QC2 pelo método de CLAE. ....	91
Tabela 9. Resultados obtidos na análise de linearidade para chalcona QC10 pelo do método de CLAE. ....	92
Tabela 10. Resultados obtidos na análise de precisão intermediária referente às concentrações teóricas (a) 16 µg/mL, (b) 20 µg/mL e (c) 24 µg/mL, para avaliação das micropartículas preparadas com Eudragit® RS100.....	92
Tabela 11. Resultados obtidos na análise de precisão intermediária referente às concentrações teóricas (a) 16 µg/mL, (b) 20 µg/mL e (c) 24 µg/mL, para avaliação das micropartículas preparadas com PLGA 503. ....	93
Tabela 12. Dados de repetibilidade na concentração teórica de 20 µg/mL para avaliação das micropartículas desenvolvidas com Eudragit® RS100. ....	93
Tabela 13. Dados de repetibilidade na concentração teórica de 20 µg/mL para avaliação das micropartículas desenvolvidas com PLGA 503. ....	94
Tabela 14. Dados de exatidão para avaliação das micropartículas desenvolvidas com Eudragit® RS100.....	94
Tabela 15. Dados de exatidão para avaliação das micropartículas desenvolvidas com PLGA 503.....	95
Tabela 16. Limite de detecção e quantificação obtidas para validação da metodologia por CLAE para as chalconas. ....	95

Tabela 17. Granulometria das micropartículas d(4,3): diâmetro médio em volume; d(0,1 µm), d(0,5 µm) e d(0,9 µm) diâmetro de partícula correspondente, respectivamente, a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada; span: polidispersão de tamanhos. ....	98
Tabela 18. Dados de EE% e teor de chalcona obtidos para micropartículas poliméricas. ....	106
Tabela 19. Dados de linearidade para as chalconas QC2 e QC10 obtidos em solução Tampão fosfato (0,1 M) pH 7,4 acrescido de 0,5 % lauril sulfato de sódio. ....	108
Tabela 20. Efeito das chalconas QC2 e QC10 nas doses de 5 ou 15 mg/kg em relação aos sistemas microparticulados de Eudragit e PLGA na curva de tolerância à glicose nas respectivas doses.....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Calc	Calculado
CED	Calorimetria exploratória diferencial
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Ctc	Crítico
DM	Diabetes melito
DOE	Planejamento experimental
DPR	Desvio padrão relativo
EE	Eficiência de encapsulação
FA	Fase aquosa
FDA	Food end Drug Administration
FI	Interações entre fatores
FO	Fase orgânica
GLUT-4	Transportador de glicose insulino-sensível
ICH	International Conference on Harmonization of The technical Requirements for Registration of Human Use
MCP	Micropartículas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Ácido poli (lático-co-glicólico)
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
PVA	Álcool polivinílico
QC10	6-quinolina N-óxido chalconas-(2E)-1-(4-Metil-fenil)- 3-(1-óxido-6-quinolinil)-2-propen-1-ona
QC11	6-quinolina N-óxido chalconas-(2E)-1-(4-Metil-fenil)- 3-(1-óxido-6-quinolinil)-2-propen-1-ona
QC2	6 quinolina chalcona - (2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(6- quinolinil)-2-propen-1-ona
QC4	6 quinolina chalcona - (2E)-1-(4-Cloro-fenil)-3-(6- quinolinil)-2-propen-1-ona
r	Coefficiente de correlação
rpm	Rotação por minuto

SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SBH	Sociedade Brasileira de Hipertensão
SUR	Receptor de sulfoniluréias
SUS	Sistema Único de Saúde
TGA	Análise termogravimétrica
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v.i.	Viscosidade intrínseca
v.o.	Via oral
Mm	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	29
2.1 DIABETES .....	29
2.2 HIPOGLICEMIANTES ORAIS .....	31
2.2.1 Sulfoniluréias .....	31
2.2.2 Meglitinidas .....	32
2.2.3 Biguanidas.....	32
2.2.4 Inibidores da $\alpha$ -glicosidase .....	33
2.2.5 Tiazolidinedionas.....	33
2.3 CHALCONAS .....	33
2.4 SISTEMAS MICROPARTICULADOS .....	36
2.4.1 Polímeros empregados em sistemas microparticulados.....	38
2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA NO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS.	41
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	45
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	45
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
2.1 MATERIAIS .....	50
2.1.1 Matérias – primas.....	50
2.1.2 Solventes, soluções e reagentes.....	50
2.1.3 Aparelhos e equipamentos.....	50
2.2 Métodos.....	51
Obtenção da amostra .....	51
2.2.1 Estudo de formulação .....	51
Preparação das micropartículas .....	51
2.2.2. Planejamento fatorial.....	52
2.2.3 Caracterização das formulações .....	54

<b>Rendimento.....</b>	<b>54</b>
<b>Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica ..</b>	<b>55</b>
<b>Eficiência de encapsulação e teor de QC2 nas micropartículas .....</b>	<b>55</b>
<b>2.2.4 Otimização da formulação de micropartículas .....</b>	<b>56</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS: ESTUDO DE FORMULAÇÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 AVALIAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA, DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E MORFOLOGIA DAS MICROPARTÍCULAS.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DE CHALCONA</b>	<b>66</b>
<b>3.5 OTIMIZAÇÃO A PARTIR DO ESTUDO DE FORMULAÇÃO..</b>	<b>70</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>2.1 MATERIAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>2.1.1 Matérias – primas .....</b>	<b>77</b>
<b>2.1.2 Solventes, soluções e reagentes.....</b>	<b>77</b>
<b>2.1.3 Aparelhos e equipamentos.....</b>	<b>77</b>
<b>2.2 MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
<b>2.2.1 Preparação das micropartículas contendo as chalconas QC2 e QC10 .....</b>	<b>79</b>
<b>2.2.2 Validação da metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....</b>	<b>80</b>
<b>Sistema Cromatográfico.....</b>	<b>80</b>
<b>Curva analítica, linearidade e intervalo.....</b>	<b>80</b>
<b>Especificidade do método.....</b>	<b>81</b>
<b>Precisão e exatidão (E).....</b>	<b>81</b>
<b>Limite de quantificação (LQ).....</b>	<b>82</b>
<b>Limite de detecção (LD). .....</b>	<b>82</b>
<b>2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de chalconas nos sistemas microparticulados.....</b>	<b>83</b>

<b>2.2.4 Caracterização físico-química dos sistemas microparticulados .....</b>	<b>83</b>
<b>Rendimento .....</b>	<b>83</b>
<b>Diâmetro médio e distribuição granulométrica .....</b>	<b>84</b>
<b>Morfologia das micropartículas .....</b>	<b>84</b>
<b>2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (CED) .....</b>	<b>84</b>
<b>2.2.6 Análise de difração de Raio-X .....</b>	<b>85</b>
<b>2.2.7 Avaliação do perfil de liberação dos sistemas microparticulados .....</b>	<b>85</b>
<b>Preparação das curvas analíticas das chalconas QC2 e QC10 no meio de dissolução. ....</b>	<b>85</b>
<b>Avaliação da solubilidade das chalconas QC2 e QC10 no meio de dissolução. ....</b>	<b>85</b>
<b>Ensaio de liberação .....</b>	<b>86</b>
<b>2.2.8 Estudos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>Animais .....</b>	<b>86</b>
<b>Curva de Tolerância à Glicose – CTG .....</b>	<b>86</b>
<b>Avaliação da glicemia .....</b>	<b>87</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS MICROPARTICULADOS DE PLGA OU EUDRAGIT® RS100 CONTENDO CHALCONAS QC2 OU QC10 .....</b>	<b>88</b>
<b>3.1.1 Desenvolvimento e validação da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE para os sistemas microparticulados .....</b>	<b>88</b>
<b>Especificidade .....</b>	<b>89</b>
<b>Linearidade e intervalo .....</b>	<b>91</b>
<b>Precisão .....</b>	<b>92</b>
<b>Exatidão .....</b>	<b>94</b>
<b>Limite de detecção e limite de quantificação .....</b>	<b>95</b>

<b>3.1.2 Avaliação físico-química das micropartículas .....</b>	<b>96</b>
Avaliação morfológica e determinação de tamanho de partícula...	96
Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (CED).....	99
Difração de Raios-X de pó. ....	103
<b>3.1.3 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de chalconas.....</b>	<b>106</b>
<b>3.1.4 Avaliação do perfil de liberação dos sistemas microparticulados. ....</b>	<b>107</b>
Avaliação da solubilidade das chalconas no meio de dissolução...	107
Preparação das curvas analíticas das chalconas no meio de dissolução.....	108
Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> dos sistemas microparticulados. ....	108
<b>3.1.5 Estudo <i>in vivo</i>.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>



## ***INTRODUÇÃO***

---

***Introdução geral – Revisão da literatura***



## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes melito (DM) configura-se como um dos principais problemas de saúde pública, sendo um dos transtornos crônicos mais frequentes no mundo. Das formas existentes, o diabetes do tipo II responsabiliza-se por aproximadamente 90 a 95 % dos casos de DM diagnosticados (VASQUES et al., 2007). O tratamento para esta patologia necessita de atenção prioritária quanto ao desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação, visando diminuir custos e melhorar as condições de vida da população. Como estratégias para a prevenção do DM incluem-se a educação e modificação dos hábitos alimentares e de exercícios físicos, complementadas por terapias medicamentosas, quando necessário (SIMMONS; UNWIN, GRIFFIN, 2010). Diversas são as substâncias utilizadas no tratamento do diabetes, tais como insulina, sulfoniluréias, biguanidas e tiazolidinedionas. Além das substâncias clássicas, várias espécies de plantas, ricas em flavonoides, vêm sendo utilizadas pela população e algumas já são descritas na literatura científica como tendo atividade hipoglicemiante (DE SOUSA et al., 2004; COLCA, 2006). As chalconas são precursores de flavonoides e isoflavonoides originalmente isolados de fontes naturais (DIMMOCK et al., 1999) e vêm sendo alvo de grande interesse químico e farmacológico por apresentarem diversas atividades, entre elas atividade hipoglicemiante. Pereira e colaboradores, em 2011, avaliaram a atividade anti-hiperglicêmica *in vivo* das chalconas derivadas da série 6-quilonil-chalconas, as quais demonstraram efeito sobre a secreção de insulina e incremento do glicogênio hepático e muscular, resultando na redução dos níveis séricos de glicose.

Agentes hipoglicemiantes necessitam doses diárias e em muitos casos mais de uma (CHEN, LANGER, 1998), sendo assim, a via oral representa uma estratégia adequada para liberação de fármacos, evitando o inconveniente da dor e de possíveis consequências indesejáveis após aplicações subcutâneas frequentes (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007). No entanto, a administração oral de fármacos constitui-se num grande desafio, uma vez que a biodisponibilidade por esta via é complexa. A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas cada vez mais adequados para veicular fármacos pela via oral é uma necessidade que se impõe àqueles envolvidos com a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos (ANSEL; POPOVICH, ALLEN, 2007). A obtenção de sistemas

terapêuticos capazes de modular a liberação de fármacos tem constituído, nos últimos anos, uma estratégia promissora para a melhoria do perfil biofarmacêutico de medicamentos.

Nesse sentido, vêm se destacando as chamadas formas farmacêuticas particuladas, que são sistemas farmacêuticos nos quais a dose administrada está subdividida em várias unidades, sendo altamente recomendados para o tratamento de patologias crônicas. Portanto, do ponto de vista biofarmacêutico, estes sistemas apresentam uma série de vantagens, envolvendo uma menor variabilidade na absorção do fármaco, menor risco de irritação do trato gastrointestinal e o menor risco de “dose dumping” (GHEBRE-SELLASSIE, 1994), aliada à possibilidade de controlar a liberação do fármaco, o que acarreta na manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos por períodos prolongados, redução de flutuações das concentrações séricas do fármaco e, conseqüentemente, redução do número de doses diárias, promovendo uma maior adesão do paciente ao tratamento. Entre os sistemas particulados, destacamos as micropartículas poliméricas.

De todos os sistemas farmacêuticos disponíveis, as micropartículas poliméricas apresentam a maior capacidade de controle de liberação do fármaco, possibilitando a otimização da posologia através da redução do número de doses diárias. Assim, estes sistemas são particularmente interessantes para o tratamento de patologias crônicas (KIM, 2005; GERWIN; HOPS; LUCKE, 2006).

Neste contexto, o desenvolvimento de sistemas para a administração oral no tratamento do diabetes melito, visando disponibilizar ao paciente uma alternativa terapêutica de administração menos frequente, com menor incidência de efeitos colaterais, administrada por uma via não invasiva e com uma melhor relação custo/benefício parece constituir uma estratégia interessante. Com isto, espera-se melhorar a adesão do paciente ao tratamento e, conseqüentemente, obter um reflexo positivo na qualidade de vida do mesmo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DIABETES

A incidência do Diabetes melito na atualidade atinge proporções epidêmicas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde no ano de 2000 havia no Brasil 4.553.000 de diabéticos e estimava-se que no ano de 2030 houvesse 11.305.000. No entanto, essa expectativa foi superada duas décadas antes do previsto. Atualmente no Brasil o número de diabéticos é de 12.054.827 (SBD, 2012). Em estudo avaliando a estimativa da prevalência global de diabetes foi relatado que em 2011 haveria aproximadamente 366 milhões de diabéticos e que em 2030 este número crescerá para mais de meio bilhão (WHITING et al., 2011).

O aumento da incidência de diabetes em termos mundiais tem sido relacionado às modificações do estilo de vida proporcionada pela industrialização. Estas modificações levam à obesidade, ao sedentarismo e ao consumo de uma dieta rica em calorias (VENKAT NARAYAN et al., 2000; NATHAN et al., 2009).

No mundo, o número de mortes atribuídas ao DM está em torno de 800 mil por ano. Entretanto, é fato bem estabelecido que essa quantidade de óbitos esteja subestimada, uma vez que uma significativa parcela destas mortes é atribuída a suas complicações, particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares. Uma figura mais realista sugere cerca de 4 milhões de óbitos anuais relacionados a essa doença, com importante contribuição de complicações cardiovasculares. Isso corresponde a aproximadamente 9 % do total mundial de mortes (SBD, 2007).

O DM não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia e que requer tratamento medicamentoso contínuo por tratar-se de uma doença crônica (BARCELO et al., 2003). A classificação mais recente, proposta pela OMS, inclui 4 classes: (i) DM tipo 1, caracterizada pela insuficiente produção de insulina pelo pâncreas, é resultante da destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas e ocorre em apenas 5-10 % dos pacientes; (ii) DM tipo 2, caracterizada pela combinação de resistência à ação da insulina e à incapacidade da célula  $\beta$  em manter uma adequada secreção de insulina, sendo esta responsável pelo acometimento de 90-95 % dos diabéticos; (iii) outros tipos específicos de DM e (iv) DM gestacional (SBD, 2007).

O DM está relacionado ao descontrole da homeostasia da glicose. A homeostasia da glicose em nosso organismo é mantida principalmente

pela regulação hormonal da captação e produção endógena de glicose pelos músculos e fígado (BEARDSALL et al., 2003). A insulina é o principal hormônio envolvido nesta regulação, sendo essencial para a manutenção da concentração de glicose no sangue após a ingestão de alimentos (VANDERWEELE, 1994; JERMENDY, 2006)(JERMENDY, 2006; VANDERWEELE, 1994)(JERMENDY, 2006; VANDERWEELE, 1994). A insuficiência da secreção e/ou ação da insulina, seja completa ou relativa, resulta na desregulação da homeostasia da glicemia, com consequente hiperglicemia e, posteriormente, no desenvolvimento do diabetes melito. Estudos mostram um aumento significativo do diabetes tipo II em jovens e crianças e a sua associação com a obesidade (GABBAY; CESARINI; DIB, 2003; ADEYEMI et al., 2012), predispondo a um alto risco cardiovascular (CERCATO et al., 2004). A resistência à insulina, ou seja, a redução da habilidade da insulina em realizar suas funções é a característica chave do diabetes tipo II (PROIETTO, 2005). Vale lembrar que a prevalência de hipertensão em diabéticos é pelo menos duas vezes maior do que na população em geral (SBH, 2002).

No ano de 2011 foram gastos R\$ 87.9 milhões de reais em internações de pacientes com diabetes melito (BRASIL, 2011). Neste contexto, o DM encontra-se entre as doenças não transmissíveis de maior impacto sobre o SUS. Da mesma forma, é preciso considerar que esta enfermidade, além do custo bastante alto para qualquer sociedade com os gastos diretos relacionados aos cuidados com a saúde, também gera custos indiretos causados pela diminuição de produtividade devido à perda de habilidades (retinopatias, nefropatias, neuropatias, entre outras) e a mortalidade prematura da população economicamente ativa (BARCELO et al., 2003).

## 2.2 HIPOGLICEMIANTES ORAIS

A todo paciente diabético tipo II a terapia não farmacológica é indicada (praticar regularmente exercícios, dieta balanceada e redução de peso). No entanto, o uso de agentes hipoglicemiantes na maioria das vezes é indispensável para manter o controle glicêmico (CHENG; FANTUS, 2005). O rígido controle da glicemia com o uso dos agentes hipoglicemiantes pode reduzir a frequência e a severidade das complicações provenientes desta patologia (ERKENS et al., 2002). Considerando que diabéticos necessitam de hipoglicemiantes orais por décadas, a segurança destes medicamentos é um fator importante a ser considerado, não só para evitar os efeitos colaterais, mas também garantir a adesão à terapia (PEDRIANES MARTÍN, DE PABLOS VELASCO, 2010). Os hipoglicemiantes orais têm uma variedade de ações, como aumentarem a secreção de insulina pelas células  $\beta$ , reduzirem a insulino resistência periférica, diminuírem a absorção de glicose do trato gastrointestinal e inibirem a produção hepática de glicose (RANG et al., 2003). Abaixo serão apresentadas as principais classes de hipoglicemiantes orais.

### 2.2.1 Sulfoniluréias

As sulfoniluréias foram desenvolvidas em meados da década de 50 e até hoje são amplamente prescritas para o tratamento do DM tipo II. As sulfoniluréias, fármacos secretagogos de insulina, são capazes de ligarem-se aos receptores de sulfoniluréias (SUR) localizados na membrana plasmática das células  $\beta$  pancreáticas. A ligação das sulfoniluréias promove o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP e, deste modo, promove a secreção da insulina estimulada pela glicose (CYRINO et al., 2003). O mecanismo de ação baseia-se no aumento da secreção de insulina pancreática em fase tardia em resposta a estímulos fisiológicos, sobretudo a hiperglicemia (PEDRIANES MARTÍN, DE PABLOS VELASCO, 2010).

Com base nas características estruturais, potencial de ação, tempo para o início e duração da ação, as sulfoniluréias são classificadas como sulfoniluréias de primeira geração (clorpropamida, tolbutamida) e de segunda geração (glimepirida, glipizida). Os principais efeitos adversos relacionados ao uso das sulfoniluréias são o ganho de peso e a hipoglicemia. A hipoglicemia está mais relacionada com a

administração das sulfoniluréias de primeira geração devido ao início de ação ser mais lento e efeito de longa duração (PALLARDO SÁNCHEZ, 2008).

### **2.2.2 Meglitinidas**

As meglitinidas (repaglinida, nateglinida) representam uma nova família de fármacos secretagogos de insulina. Esta nova classe de agentes hipoglicemiantes de ação rápida tem sido desenvolvida para o tratamento das flutuações glicêmicas específicas em relação ao consumo pós-prandial. Seu efeito é mais rápido e mais curto em relação aos outros secretagogos de insulina. Apresentam efeito hipoglicemiante trinta minutos após sua ingestão e tempo de meia vida de 60 minutos. Devido a estas características são necessárias três doses diárias (PEDRIANES MARTÍN, DE PABLOS VELASCO, 2010). O mecanismo de ação também se deve à ligação aos receptores de sulfoniluréias, porém em outros sítios de ligação (MORENO PÉREZ et al., 2008).

### **2.2.3 Biguanidas**

O principal representante dessa classe é a metformina, sendo amplamente utilizada na clínica (BODMER et al., 2008), apesar de seu mecanismo de ação ainda não ser totalmente esclarecido. O principal efeito clínico da metformina é a redução dos níveis séricos de glicose e lipídeos, devido à redução da gliconeogênese hepática, glicogenólise e da absorção intestinal de glicose. A metformina também aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos pela ativação da via adenosina monofosfato cíclico AMPc, resultando no aumento da absorção da glicose em tecidos periféricos (ROSAK, 2002; OTA et al., 2009; CHEN et al., 2011; KRAUSOVA et al., 2011). As biguanidas são úteis em pacientes com diabetes tipo II obesos e que não respondem eficientemente ao tratamento apenas com dieta.

Como a metformina não aumenta a secreção de insulina, consequentemente não produz hipoglicemia. Seus principais efeitos adversos são do tipo gastrointestinal (dor abdominal, diarreias e vômitos), habitualmente transitório e dependente da dose (BODMER et al., 2008).



### 2.2.4 Inibidores da $\alpha$ -glicosidase

Os inibidores das  $\alpha$ -glicosidase (ex: acarbose, miglitol) não apresentam um alvo específico na patologia diabetes DM. Esta classe de fármacos inibe a captação de carboidratos da dieta através da inibição das  $\alpha$ -glicosidases da orla ciliada intestinal, suprimindo, desta forma, a hiperglicemia após as refeições. Os principais efeitos colaterais dos inibidores são desconforto abdominal, diarreia e flatulência (PEDRIANES MARTÍN, DE PABLOS VELASCO, 2010).

### 2.2.5 Tiazolidinedionas

Os principais representantes desta classe são rosiglitazona e pioglitazona. Atuam reduzindo a resistência à insulina nos tecidos periféricos (tecido adiposo, músculo e fígado) mediante a estimulação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) e na redistribuição de gordura no tecido adiposo visceral subcutâneo, com o aumento da secreção da adipocina (BARNETT et al., 2007). O potencial da atividade insulínica nestes tecidos é favorecido pela captação da glicose sanguínea por diversos receptores como transportador de glicose insulino-sensível (GLUT-4) (CIARALDI et al., 2002).

## 2.3 CHALCONAS

Na última década o tratamento do DM foi inteiramente modificado, sendo apontado como um dos principais objetivos a prevenção da doença (SBD, 2007), complementada por terapias medicamentosas, quando necessário. Nesse sentido, além das substâncias classicamente utilizadas no tratamento do diabetes, várias espécies de plantas vêm sendo descritas na literatura científica como tendo atividade hipoglicemiante (COLCA, 2006; DE SOUSA et al., 2004).

Inúmeras espécies de plantas com comprovadas propriedades hipoglicemiantes apresentam uma composição química rica em flavonoides, um grupo de compostos fenólicos amplamente encontrados em plantas. Muitos estudos demonstraram o efeito hipoglicemiante de flavonoides isolados e de frações enriquecidas com flavonoides (JORGE et al., 2004; DE SOUSA et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2006;

ZANATTA et al., 2008; KUMAR et al., 2008). Chalconas são uma das principais classes de produtos naturais com ampla distribuição em frutas, vegetais, especiarias, chás e alimentos a base de soja (DI CARLO et al., 1999).

As chalconas são precursores dos flavonoides e isoflavonoides originalmente isoladas de fontes naturais (DIMMOCK et al., 1999), sendo alvo de grande interesse químico e farmacológico por apresentarem diversas atividades biológicas, as quais variam conforme os diferentes substituintes destas moléculas.

Estruturalmente, as chalconas, possuem como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou hidroxila (figura 1). São caracterizadas pela abertura do anel oxigenado, levando à formação de uma ligação dupla com os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  em função da carbonila (ZUANAZZI, MONTANHA, 2004).

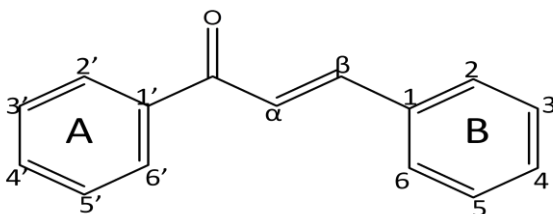


Figura 1. Núcleo fundamental das chalconas (1,3-difenil-2-propenona).

Na literatura são referenciados, para as chalconas, efeitos antibacteriano (NIELSEN et al., 2004; SATO et al., 1996), antifúngico (BATOVSKA et al., 2007; LAHTCHEV et al., 2008; DE CARVALHO TAVARES et al., 2011), antiviral (CHEENPRACHA et al., 2006; KIAT et al., 2006; TRIVEDI et al., 2007), antimalárico (DOMÍNGUEZ et al., 2005; VALLA et al., 2006; KARTHIKEYAN; HOLLA; KUMARI, 2007; KAUR et al., 2010; TOMAR et al., 2010), anti-leishmania (CHEN et al., 2001), anti-inflamatório (DESHPANDE et al., 1999; HERENCIA et al., 2001; AHMAD et al., 2006; ISRAF et al., 2007; VOGEL et al., 2010), antiplaquetário (ZHAO et al., 2005; VIJAYA BHASKAR REDDY et al., 2011) e antitumoral (LAWRENCE et al., 2006; LIU; GO, 2006; DELMULLE et al., 2006; BANDGAR et al., 2010; YADAV et al., 2011). Diversos estudos foram realizados no sentido de avaliar o potencial terapêutico destas moléculas no DM. Tem sido demonstrado que chalconas extraídas de plantas apresentam

atividades similares à insulina e melhoram a absorção da glicose nos adipócitos (ENOKI et al., 2007).

Chalconas isoladas das raízes da *Broussonetia papyrifera* demonstraram exercer atividade inibitória sobre os receptores de insulina, sendo esta atividade diretamente proporcional à quantidade de substituintes apolares na molécula (CHEN et al., 2002). Chalconas derivadas de ariloxipropanolaminas apresentam potente atividade anti-hiperglicêmica quando administradas em ratos normais hiperglicêmicos e em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina (SATYANARAYANA et al., 2004). Derivados de chalconas estimulam a captação de glicose e potenciam a captação de glicose estimulada por insulina em adipócitos *in vitro* (KAMEI et al., 2003).

Chalconas derivadas de 3,4 methilenedioxi com substituinte nitro (grupo aceptor de elétrons) apresentam atividade sobre a secreção de insulina e de redução da glicemia semelhante àquela promovida pelo fármaco controle glipizida em ratos hiperglicêmicos (DAMAZIO et al., 2009). A atividade anti-hiperglicêmica foi avaliada também para chalconas derivadas de naftilchalconas, as quais apresentam efeito agudo na redução da glicose sérica em ratos hiperglicêmicos. Análogos desta série foram capazes de promover uma significativa secreção de insulina estimulada pela glicose (DAMAZIO et al., 2010).

Alberton e colaboradores (2008) avaliaram o efeito anti-hiperglicêmico *in vivo* de diferentes substituintes em chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído. As chalconas que apresentaram atividade biológica tiveram seus efeitos avaliados sobre a glicemia em ratos hiperglicêmicos comparadas com insulina, insulina lispro e tolbutamina, evidenciando um significativo efeito da substituição, do tipo de substituinte e da posição do anel onde ocorreu a substituição. Os compostos mais ativos, metoxisubstituídos nas posições 3' e 4' do anel A, inibiram a hiperglicemia induzida por glicose numa taxa de 96% daquela obtida por insulina lispro e tolbutamida, controles positivos do ensaio, a 60 minutos da administração, o que pode ser considerado um resultado extremamente promissor.

Recentemente, Pereira e colaboradores (2011), avaliaram a atividade anti-hiperglicêmica *in vivo* das chalconas derivadas da série 6-quilonil-chalconas.

Os derivados da série 6-quilonil-chalconas apresentam pequenas alterações em seus radicais, conforme demonstrado na figura 2. Nos derivados 6 quinolina chalcona - (2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(6-quinolinil)-2-propen-1-ona (QC2) e 6 quinolina chalcona - (2E)-1-(4-Cloro-fenil)-

3-(6-quinolinil)-2-propen-1-ona (QC4) o nitrogênio do anel quinolínico não está oxidado, enquanto que os derivados 6-quinolina N-óxido chalconas-(2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(1-óxido-6-quinolinil)-2-propen-1-ona (QC10) e 6-quinolina N-óxido chalconas-(2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(1-óxido-6-quinolinil)-2-propen-1-ona (QC11) apresentam o anel quinolínico oxidado.

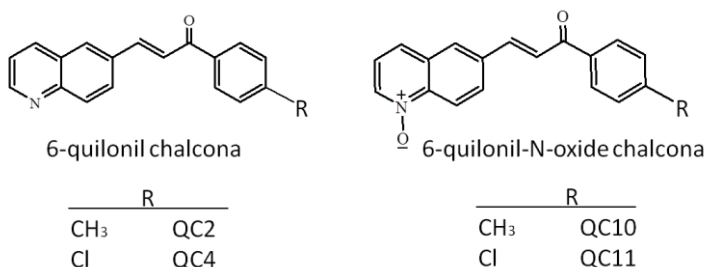


Figura 2. Estrutura molecular das chalconas 6-quilonil chalcona e 6-quilonil-N-oxide-chalcona.

As chalconas da série 6-quilonil promovem a secreção de insulina e incremento do glicogênio hepático e muscular. O efeito sobre a redução da glicose sérica parece estar relacionado à secreção de insulina (propriedade anti-hiperglicêmica) e à ação das chalconas em vários alvos de insulina (efeito hipoglicemiante), contribuindo para a homeostasia da glicose (PEREIRA, 2011).

## 2.4 SISTEMAS MICROPARTICULADOS

O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos é um segmento da pesquisa farmacêutica que vem crescendo exponencialmente em nível mundial nos últimos anos, interesse este traduzido pelo crescente investimento nesta área. Contudo, a pesquisa e o desenvolvimento dos fitoterápicos envolvem diversos aspectos e etapas, onde diversos fatores como a variação na composição e nos teores dos constituintes ativos devem ser levados em consideração. Neste sentido, a utilização de moléculas isoladas de plantas ou obtidas por síntese reduz os problemas relacionados a estas variações, diminuindo o tempo e os investimentos necessários para a obtenção de um medicamento, com todos os requisitos de qualidade, segurança e constância de composição que isto supõe.

Desta forma, a decisão sobre o tipo de forma farmacêutica na qual esta molécula será incluída envolve a avaliação de sistemas que possibilitem o maior aproveitamento do potencial terapêutico da mesma. Particularidades que poderiam comprometer a eficácia do tratamento, tais como irregularidade de absorção, toxicidade elevada, estreita faixa terapêutica, rápida metabolização ou ainda utilização em esquemas terapêuticos de longa duração devem ser consideradas. Em se tratando de administração rotineira, como é o caso de agentes hipoglicemiantes (CHEN, LANGER, 1998), a via oral representa uma estratégia adequada para liberação de fármacos, evitando o inconveniente da dor e de possíveis consequências indesejáveis após aplicações subcutâneas (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007). No entanto, a administração oral de fármacos constitui-se num grande desafio, uma vez que a biodisponibilidade por esta via é complexa. A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas cada vez mais adequados para veicular fármacos pela via oral é uma necessidade que se impõe àqueles envolvidos com a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos (ANSEL; POPOVICH, ALLEN, 2007).

As micropartículas apresentam um diâmetro médio variando de um a algumas centenas de micrômetros, e são classificadas em microesferas e microcápsulas, de acordo com sua estrutura. As microesferas apresentam estrutura matricial, constituída por uma rede polimérica na qual a substância ativa encontra-se dispersa ou adsorvida, enquanto que as microcápsulas têm estrutura de reservatório, constituídas por um núcleo interno recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (ANSEL; POPOVICH, ALLEN, 2007; SILVA et al., 2003). O mecanismo de liberação do fármaco encapsulado no interior da partícula envolve processos de natureza difusional e/ou a degradação enzimática da rede polimérica previamente formada (WANG et al., 1990; BATYCKY et al., 1997; FAISANT; SIEPMANN; BENOIT, 2002). O reduzido tamanho das partículas dos sistemas microestruturados permite uma distribuição mais homogênea, favorece a interação com o epitélio subjacente e com a mucosa gástrica (DURRER et al., 1994).

A escolha de um método de microencapsulação adequado para promover o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos depende das características físico-químicas do fármaco a encapsular, das condições operacionais e dos polímeros utilizados (SILVA et al., 2003).

A seleção da técnica de preparação das micropartículas deve levar em consideração certos requisitos, como a manutenção da

estabilidade e atividade biológica do fármaco, taxa de encapsulação, reprodutibilidade das características das micropartículas e do perfil de liberação. Na literatura, são relatados inúmeros métodos de preparação de micropartículas, sendo que um dos mais utilizados é o método de emulsificação seguida de evaporação ou extração do solvente. Neste método, é preparada uma emulsão cuja fase interna, orgânica, contém o fármaco e o polímero dissolvido. A eliminação do solvente orgânico por evaporação ou extração faz com que o polímero solidifique, mantendo o fármaco no interior da partícula formada. Este método, via de regra, proporciona uma alta taxa de encapsulação de fármacos lipofílicos, como é o caso das chalconas (WISCHKE, SCHWENDEMAN, 2008).

#### **2.4.1 Polímeros empregados em sistemas microparticulados**

Os polímeros apresentam-se como uma das classes de materiais mais versáteis disponíveis para aplicações em diferentes áreas, principalmente na área farmacêutica (VILLANOVA; ORÉFICE, CUNHA, 2010) constituindo um avanço tecnológico que tem permitido o desenvolvimento de diferentes sistemas de liberação controlada de fármacos, como as nano e micropartículas. Os sistemas poliméricos apresentam boa estabilidade no ambiente biológico e os diferentes métodos de preparação permitem encapsular fármacos com características tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, conferindo uma grande variedade de aplicações terapêuticas (VILOS, VELASQUEZ, 2012).

Dentre as propriedades consideradas essenciais relacionadas aos polímeros usados em aplicações farmacêuticas destacam-se a biodegradabilidade, que corresponde à capacidade de degradar-se em ambiente biológico gerando compostos atóxicos que são metabolizados ou excretados, e biocompatibilidade, o que significa que não causa efeito adverso local ou sistêmico após sua administração (LI; ROUAUD, PONCELET, 2008).

Vários polímeros têm sido empregados na preparação de micropartículas, entre eles os homopolímeros do ácido láctico e do ácido glicólico, a poli- $\epsilon$ -caprolactona, os co-polímeros do ácido metacrílico e dos ésteres acrilatos, além de diferentes polissacarídeos, tais como a celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas (FRANK; RATH; VENKATRAMAN, 2005; KATOU; WANDREY; GANDER, 2008; CHOI et al., 2011; VASCONCELLOS; GOULART; BEPPU, 2011; KEMALA; BUDIANTO; SOEGIYONO, 2012). A escolha dos

polímeros deve considerar aspectos peculiares de cada fármaco, tendo em vista que estes apresentam propriedades características no que se refere ao perfil farmacocinético, solubilidade em água, estabilidade física e química e dose terapêutica, não sendo possível tecer generalizações. A maioria destes polímeros atribui aos sistemas microparticulados características mucoadesivas (KOCKISCH et al., 2003;2004), tornando-os materiais de interesse para formulações de fármacos administrados por via oral (THANOU; VERHOEF, JUNGINGER, 2001). Esta característica vem a melhorar a absorvidade do sistema, de modo que aumenta o tempo de permanência no sítio específico de absorção, além de reduzir a frequência de dose (KIM et al., 2005).

Dentre os polímeros que vêm sendo usados na confecção de micropartículas poliméricas para a administração oral destacamos o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e o Eudragit®.

O PLGA, copolímero dos ésteres alifáticos, ácido láctico e ácido glicólico, tornou-se o mais empregado em formulações comparado a outros polímeros biodegradáveis devido à sua segurança e aprovação do uso em humanos pelo FDA (Food and Drug Administration) (GUSE et al., 2006; GITEAU et al., 2008; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008; KLOSE et al., 2010; MAKADIA, SIEGEL, 2011).

Com relação ao controle da velocidade de liberação e degradação das partículas, o PLGA apresenta uma flexibilidade que depende das características do polímero relacionadas à cristalinidade, solubilidade e erosão da superfície (ALBERTSSON, VARMA, 2002; SEYEDNEJAD et al., 2011; VERT et al., 1998). Este controle se dá através de parâmetros como a massa molar do polímero, onde a velocidade de degradação é inversamente proporcional ao peso molecular; e o tempo de degradação depende da proporção entre os monômeros, de tal modo que os polímeros com concentração mais elevada de ácido láctico exibem degradação mais lenta (GÖPFERICH, 1996; ALBERTSSON; VARMA, 2002; EDLUND; ALBERTSSON, 2002; MUNDARGI et al., 2008; STEVANOVIC; USKOKOVIC, 2009; MAKADIA; SIEGEL, 2011; VILOS; VELASQUEZ, 2012). Em meio aquoso, o PLGA sofre hidrólise das ligações ésteres da cadeia principal, e a presença de grupamentos metila no ácido láctico faz com que o mesmo se torne mais hidrofóbico comparado ao ácido glicólico, absorvendo menos água e consequentemente degradando mais lentamente (HOUCHIN, TOPP, 2009; MAKADIA, SIEGEL, 2011).

Em se tratando de um sistema particulado de PLGA onde há a presença de um fármaco, o perfil de liberação pode ser influenciado por outros fatores como o tipo de fármaco (FRANK; RATH, VENKATRAMAN, 2005; MAKADIA, SIEGEL, 2011), o método de preparação (SANSRAP; MOËS, 1993; O'DONNELL; MCGINITY, 1997; MANDAL, 1998; THOTE et al., 2005), tamanho de partícula (DUNNE; CORRIGAN; RAMTOOLA, 2000; BERKLAND; KIM; PACK, 2003; SIEPMANN et al., 2005; KANG; SCHWENDEMAN, 2006), porosidade do sistema (KANG, SCHWENDEMAN, 2006; KLOSE et al., 2006), peso molecular do polímero (PARK; LU, CROTTS, 1995; RAVIVARAPU; BURTON, DELUCA, 2000), a relação entre os monômeros ácido láctico:ácido glicólico (RAVIVARAPU; BURTON, DELUCA, 2000) e as características do fármaco (FRANK; RATH, VENKATRAMAN, 2005; KLOSE; DELPLACE, SIEPMANN, 2011).

Já os Eudragit<sup>®</sup> RS e RL são copolímeros de poli(etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetil amônio etil metacrilato) que contêm grupos quaternários entre 4,5 a 6,8 % e 8,8 a 12 % para as formas RS e RL, respectivamente (HAZNEDAR, DORTUNÇ, 2004). Ambos são insolúveis em pH fisiológico, mas capazes de intumescerem (OMARI et al., 2004; TRAPANI et al., 2007). Estes polímeros vêm sendo amplamente utilizados na encapsulação de fármacos para a administração por via oral (WATTS; DAVIES; MELIA, 1991; PERUMAL, 2001; GIBSON et al., 2006; TRAPANI et al., 2007; JAVOT et al., 2009; CRUZ et al., 2010; ALHNAN; BASIT, 2011), via transdérmica (MUKHERJEE et al., 2005; NESSEEM; EID, EL-HOUSENY, 2011) e via oftálmica (PIGNATELLO; BUCOLO; PUGLISI, 2002; ARAÚJO et al., 2009; DAS; SURESH; DESMUKH, 2010).

O polímero Eudragit<sup>®</sup> RS100 contém apenas 5 % (m/m) de unidades hidrofílicas e exibe uma baixa permeabilidade, permitindo, desta forma, a produção de formulações de liberação sustentada (ESPOSITO et al., 2002). Além das características a eles conferidas, outro fator a ser considerado é o baixo custo do Eudragit<sup>®</sup> em comparação a outros polímeros, como por exemplo, o PLGA. A questão custo é um fator muito importante em casos de uma possível produção industrial em larga escala.



## 2.5 PLANEJAMENTO FATORIAL COMO FERRAMENTA NO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS

No desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos os principais objetivos a serem alcançados são a obtenção de formulações estáveis, com bom rendimento, eficiência de encapsulação elevada e com tamanho e perfil de liberação adequado ao tipo de administração a que se destinam. De maneira geral, inúmeras variáveis, tanto de produto como de processo, contribuem simultaneamente para a consecução destes objetivos.

Atualmente, a maior parte dos estudos para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos ainda é realizada alterando os níveis de cada variável (ou fator) separadamente, mantendo os demais fatores constantes, a fim de se estudar os efeitos específicos desta variável sobre a resposta desejada. Esse tipo de experimento tradicional, variando isoladamente cada um dos fatores, é uma estratégia pouco eficiente e pouco econômica porque implica em um número elevado de experimentos, bem como depende da experiência do analista para interpretar a importância de cada fator, a fim de obter um sistema otimizado no final do processo (KINCL; TURK, VREČER, 2005).

Devido às inúmeras variáveis de formulação e de processos envolvidos durante a otimização em sistemas microparticulados, é fortemente recomendado a utilização de métodos estatísticos apropriados (*DOE - design of experiments*), tais como planejamentos experimentais, para obter sistemas com os atributos desejados. Um planejamento experimental adequado, a partir de modelos estatísticos, permite ao formulador avaliar os efeitos principais das variáveis de formulação e de processo, assim como as interações entre elas, na qualidade e características de liberação das partículas (CUN et al., 2011; SONAGLIO et al., 2004).

Um planejamento experimental permite obter a quantidade máxima de informações a partir dos dados coletados em um número reduzido de ensaios experimentais. A ideia básica é mudar todos os fatores relevantes simultaneamente, sobre um conjunto de ensaios planejados e, em seguida, conectar e interpretar os resultados utilizando modelos matemáticos (GABRIELSSON; LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002).

Dentre os métodos de planejamentos experimentais disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja

estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (BARROS NETO; SCARMINIO, BRUNS, 1995).

Em estudos nos quais estejam envolvidos muitos fatores é recomendada a utilização de um planejamento fatorial fracionado, especialmente quando se trata de um estudo de formulação. Em um planejamento fatorial fracionado os experimentos são escolhidos para gerar o máximo de variações com o menor número de experimentos (GABRIELSSON; LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002), permitindo a identificação de interações entre fatores e determinar com precisão o efeito de um fator entre os fatores estudados (JAFARI NEJAD et al., 2010).

## **OBJETIVOS**

---

*Objetivo geral e específicos*



## OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados contendo chalconas com comprovada atividade hipoglicemiante, visando à obtenção de novos medicamentos de administração oral para o tratamento do Diabetes melito.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo de formulação para estabelecer a composição dos sistemas e o método de preparação mais adequado através de métodos quimiométricos (desenho experimental), visando à otimização de uma formulação.
- Desenvolver e validar um método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação das chalconas a serem encapsuladas.
- Desenvolver sistemas microparticulados contendo chalconas a partir da formulação otimizada.
- Caracterizar os sistemas desenvolvidos quanto à morfologia, tamanho de partícula, eficiência de encapsulação, teor, estabilidade térmica e padrão de difração de raio-X da molécula.
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* das chalconas.
- Avaliar a atividade *in vivo* dos sistemas microparticulados contendo chalconas desenvolvidos em modelos de hiperglicemia.



## ***CAPÍTULO 1***

---

***Estudo de formulação utilizando um planejamento fatorial fracionado  
objetivando a otimização de um sistema microparticulado***





## 1. INTRODUÇÃO

No desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica, via de regra faz-se necessário um estudo de formulação que permita ao pesquisador reunir o maior número de informações possíveis sobre todos os fatores, tanto de composição como de processo, para estabelecer os parâmetros que permitam obter um produto eficaz, seguro e de qualidade.

Nas últimas décadas, a área da Tecnologia Farmacêutica tem focado seus esforços e investimentos no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada, de maneira a melhorar as propriedades biofarmacêuticas das moléculas ativas associadas. Entre os diversos sistemas capazes de proporcionar o controle de liberação do fármaco destacam-se os sistemas microparticulados. As micropartículas possibilitam a redução do número de doses diárias do medicamento, levando à redução de flutuações das concentrações séricas dos fármacos e à manutenção da concentração plasmática em níveis terapêuticos, sendo, portanto, particularmente interessantes para o tratamento de patologias crônicas (KIM et al., 2005).

Este capítulo trata do desenvolvimento, caracterização e otimização de um sistema microparticulado de PLGA contendo a chalcona QC2 como molécula modelo, utilizando a técnica de evaporação e/ou extração do solvente a partir de uma emulsão o/a. A chalcona QC2 apresenta baixa solubilidade em meio aquoso. Devido ao grande número de fatores que podem influenciar decisivamente características das micropartículas obtidas por esta técnica, como a concentração de tensoativo, quantidade de fármaco, volume de fase orgânica, volume da fase aquosa, volume da fase de extração, foi realizado um estudo detalhado de formulação com o objetivo de estabelecer as melhores condições de obtenção destes sistemas. Neste estudo foi utilizado um planejamento fatorial fracionado e, como ferramenta estatística, utilizou-se o programa Desing-Expert®.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

#### **2.1.1 Matérias – primas**

Ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA, 50:50) Resomer<sup>®</sup> 503 - Boehringer Ingelheim  
Chalcona QC2 (6-quinolinachalcona - (2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(6-quinolinil)-2-propen-1-ona) Massa molar 273,32 g/mol.

#### **2.1.2 Solventes, soluções e reagentes**

Água ultra pura Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>)  
Água purificada  
Diclorometano P.A. (Qhemis)  
Álcool polivinílico - PVA (Mowiol 40-88 – Sigma–Aldrich)

#### **2.1.3 Aparelhos e equipamentos**

Aagitador magnético ARE Heating Magnetic Stirrer (VELP Scientifica)  
Aagitador magnético DI-06 com banho termostatzado (Dist)  
Aparelho de hidrodestilação FABBE  
Balança Ohaus Analytical Standard  
Banho de Ultrassom – UltraSonic Cleaner USC 700 Unique  
Bomba de vácuo  
Centrífuga Sigma 4K15  
Espectrofotômetro Shimadzu UV/Vis 2000  
Freezer Consul 180  
Granulômetro a Laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments)  
Liofilizador Terroni LD 1500  
Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM – 6390LV (Jeol Ltda.)

## 2.2 MÉTODOS

### **Obtenção da amostra**

A chalcona 6 quinolina chalcona-(2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(6-quinolinil)-2-propen-1-ona (QC2) utilizada neste trabalho foi sintetizada pela equipe do Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti do grupo de Pesquisa Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **2.2.1 Estudo de formulação**

##### **Preparação das micropartículas**

As micropartículas foram preparadas pela técnica de emulsão o/a com evaporação ou extração do solvente, adaptado de Wischke e colaboradores (2008). Para a preparação da fase orgânica da emulsão (FO), o polímero (PLGA) e a chalcona QC2 foram solubilizados em diclorometano com auxílio de banho de ultrassom, mantendo entre a massa do polímero e o volume do solvente orgânico uma concentração fixa de 100 mg/mL. Esta solução orgânica foi transferida para um béquero contendo uma solução de PVA (fase aquosa da emulsão, FA) sob agitação magnética a 750 rpm, obtendo assim a emulsão o/a. A agitação foi mantida por 3 horas para a eliminação do solvente orgânico por evaporação. Alternativamente, 3 minutos após a adição da fase orgânica, uma solução de PVA (fase de extração, FE) foi adicionada à emulsão para eliminação do solvente orgânico por extração. Após a completa eliminação do solvente, as formulações foram mantidas em repouso por 10 minutos para a sedimentação das micropartículas, sendo, a seguir, descartado o sobrenadante. O resíduo de PVA da fase externa foi removido por meio de lavagem das micropartículas com 70 mL de água, seguido de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos e descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido por três vezes. A seguir, as micropartículas foram coletadas e transferidas para um frasco âmbar com volume final de aproximadamente 8 mL. Esta suspensão foi congelada a -20°C por pelo menos 48 horas. As amostras congeladas foram liofilizadas por um período de 24 horas e posteriormente armazenadas em dessecador.

## 2.2.2 Planejamento fatorial

O desenvolvimento das micropartículas foi realizado a partir de um planejamento experimental, no qual foram selecionados cinco fatores: (A) concentração de PVA na fase aquosa da emulsão (% , m/m), (B) quantidade de chalcona (mg), (C) volume de fase orgânica, (D) volume da fase aquosa e (E) volume da fase de extração. A seleção dos fatores analisados foi baseada em dados da literatura e por testes prévios.

O modelo estabelecido foi um delineamento fatorial do tipo fatorial fracionado ( $2^{5-1}$ ), com auxílio do programa Design-Expert® (version 8.0.6.1, Stat Ease, Inc, MN, USA), sendo cada fator avaliado em dois níveis (máximo e mínimo). A adição de quatro repetições de um ponto central foi utilizado para avaliar a curvatura das respostas, bem como avaliar o efeito do ruído/erro e prover um número de graus de liberdade necessários para uma adequada avaliação do modelo estatístico. O efeito de cada fator sobre as respostas foi calculado assumindo modelo linear com interação de primeiro grau (2FI) entre os fatores, conforme equação de regressão abaixo (equação 1),

$$Y = m + aA + bB + cC + dD + eE + abAB + acAC + adAD + aeAE + bcBC + bdBD + beBE + cdCD + deDE$$

Equação 1

onde  $Y$  é a resposta do modelo,  $m$  é a média dos valores obtidos,  $a, b, c, d$ , e  $e$  são os coeficientes (efeitos) dos fatores principais ( $A, B, C, D$ , e  $E$ ),  $ab$ ,  $ac$ ,  $ad$ ,  $ae, bc, bd$ ,  $be$ ,  $cd$  e  $de$  são os coeficientes das interações entre dois fatores ( $AB, AC, \dots, DE$ ). Para a estimativa de significância do modelo e dos efeitos de cada fator, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada para cada resposta. Os modelos e os efeitos de cada fator e interação foram considerados significantes quando o valor de probabilidade de significância ( $p$ ) foi igual ou inferior a 0,05. Os termos do modelo não significativos foram removidos do modelo matemático, exceto no caso de serem necessários para satisfazer a hierarquia, como um termo que compõe uma interação significativa.

A tabela 1 apresenta os fatores e os níveis envolvidos no estudo de formulação das micropartículas.

Tabela 1. Fatores e respectivos níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado ( $2^{5-1}$ ) para o estudo de formulação das micropartículas.

Fatores/ Níveis	A (%)	B (mg)	C (mL)	D (mL)	E (mL)
Inferior	0,5	10,0	3,0	50,0	0,0
Central	0,75	15,0	4,0	75,0	50,0
Superior	1,0	20,0	5,0	100,0	100,0

Os experimentos foram realizados aleatoriamente, conforme sequência descrita na tabela 2.

Tabela 2. Delineamento fatorial  $2^{5-1}$  referente ao estudo de formulação para a obtenção das micropartículas.

Fatores/ Experimentos	A	B	C	D	E
1	1,00	20,0	5,0	50,0	0,0
2	0,75	15,0	4,0	75,0	50,0
3	0,50	20,0	5,0	100,0	0,0
4	0,75	15,0	4,0	75,0	50,0
5	0,50	20,0	5,0	50,0	100,0
6	0,50	20,0	3,0	50,0	0,0
7	0,75	15,0	4,0	75,0	50,0
8	1,00	10,0	5,0	100,0	0,0
9	0,50	10,0	5,0	100,0	100,0
10	0,50	10,0	3,0	100,0	0,0
11	1,00	10,0	3,0	50,0	0,0
12	0,50	10,0	3,0	50,0	100,0
13	0,50	20,0	3,0	100,0	100,0
14	0,75	15,0	4,0	75,0	50,0
15	1,00	20,0	3,0	100,0	0,0
16	1,00	10,0	5,0	50,0	100,0
17	1,00	10,0	3,0	100,0	100,0
18	0,50	10,0	5,0	50,0	0,0
19	1,00	20,0	5,0	100,0	100,0
20	1,00	20,0	3,0	50,0	100,0

### 2.2.3 Caracterização das formulações

#### Rendimento

O rendimento foi calculado pela relação entre a massa obtida de micropartículas e a quantidade total de polímero e chalcona utilizada no preparo das formulações. O resultado foi apresentado em porcentagem conforme a equação 2.

$$\text{Rendimento} = \left( \frac{\text{micropartículas (mg)}}{\text{polímero} + \text{chalcona (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 2

### **Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica**

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das micropartículas foram avaliados por difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 Hydro, com luz monocromática vermelha de um laser de HeNe. Para a realização destas análises as amostras foram dispersas em água destilada com auxílio de ultrassom por 10 minutos.

A distribuição granulométrica foi inferida a partir dos valores de span e calculada conforme a equação 3. Os valores  $d_{90\%}$  e  $d_{10\%}$  correspondem ao diâmetro médio menor ou igual a 90% e 10% respectivamente da distribuição da população  $d_{50\%}$  corresponde o diâmetro da mediana e  $(D[4,3])$  corresponde ao diâmetro da esfera que possui o mesmo volume médio das partículas constituintes do sistema, este parâmetro assume que as partículas são esféricas e de mesmo volume que as partículas reais.

$$\text{Span} = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}}$$

Equação 3

### **Morfologia das partículas**

As micropartículas foram analisadas quanto à formação e aparência por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em aumento de 20 a 500 vezes, em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM, disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME).

### **Eficiência de encapsulação (EE) e teor de QC2 nas micropartículas**

Na quantificação da QC2 associada às micropartículas utilizou-se a técnica de espectroscopia no UV/Vis. Para isto, uma curva padrão foi construída preparando uma solução mãe de 1000 µg/mL em balão

volumétrico de 10 mL. A partir desta solução foram preparadas, em triplicata, curvas de linearidade na faixa de 0,5 a 5,0 µg/mL. As absorbâncias obtidas foram representadas frente às concentrações para a construção da curva. A equação da reta foi obtida por regressão linear e o coeficiente de correlação calculado. A linearidade da curva analítica foi avaliada em relação ao coeficiente de correlação (r), o qual deve ser superior ou igual a 0,99 para que seja considerada linear (BRASIL, 2003).

Na determinação da EE exatamente cerca de 10 mg de micropartículas foram solubilizadas em diclorometano e analisadas por UV/Vis. Os valores de absorbância foram substituídos na equação da reta e desta forma foi definida a massa de chalcona encapsulada por formulação em relação à massa total de chalcona utilizada, conforme descrito na equação 4.

$$EE\% = \left( \frac{\text{massa de chalcona encapsulada (mg)}}{\text{massa total de chalcona utilizada (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 4

Para a determinação do teor foi calculada a massa de QC2 encapsulada em 100 mg de micropartículas, conforme descrito na equação 5.

$$\text{Teor} = \left( \frac{\text{massa de chalcona encapsulada (mg)}}{\text{massa de micropartículas (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 5

#### **2.2.4 Otimização da formulação de micropartículas**

A partir dos modelos matemáticos gerados pelo planejamento experimental, realizou-se a etapa de otimização, estabelecendo-se como principais critérios o tamanho de partícula, a eficiência de encapsulação e o teor de chalcona encapsulada. Com base nestes parâmetros, uma formulação teórica foi proposta. A formulação otimizada foi preparada e os resultados obtidos experimentalmente para estes parâmetros foram comparados aos valores preditos pelo programa. Os resultados são considerados reprodutíveis quando a diferença entre o valor predito e o obtido na prática foi inferior a 10%.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS: ESTUDO DE FORMULAÇÃO

A técnica de evaporação ou extração do solvente a partir de uma emulsão o/a é a mais comumente utilizada para encapsular substâncias lipofílicas (JEFFERY; DAVIS; O'HAGAN, 1991; HUANG; CHUNG; TZENG, 1997; WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008). Por esta técnica, diversos fatores podem influenciar na obtenção e características das micropartículas, sendo os mais discutidos (i) a concentração, composição e peso molecular do polímero; (ii) a concentração e a natureza da substância a ser encapsulada; (iii) a concentração e a natureza do agente emulsionante; (iv) a velocidade de agitação e (v) as viscosidades e a razão entre os volumes da fase dispersa (fase oleosa) e dispersante (fase aquosa) (SANSRAP, MOËS, 1993; ZHANG et al., 2008).

Devido à contribuição de todos esses fatores, faz-se necessário um estudo detalhado de formulação, no qual a combinação de diferentes variáveis permite estabelecer as condições de obtenção de sistemas adequados para o uso a que se destina. No entanto, em um planejamento fatorial completo, o número de ensaios necessários aumenta rapidamente com o número de fatores investigados. Um planejamento com cinco fatores, por exemplo, exigiria pelo menos 32 ensaios ( $2^5$ ), o que demanda tempo e custos para realizar todos os ensaios. À medida que o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais fatores não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação (BARROS NETO, 2002). Neste sentido, um planejamento reduzido, chamado de planejamento fatorial fracionado, é uma escolha apropriada para um estudo de formulação. No planejamento fatorial fracionado os experimentos são escolhidos para gerar o máximo de variações com o menor número de ensaios (GABRIELSSON; LINDBERG, LUNDSTEDT, 2002).

Para o estudo proposto, no qual se estabeleceram como variáveis a concentração do tensoativo da fase aquosa da emulsão (PVA), a quantidade de chalcona, o volume de fase orgânica da emulsão, o volume da fase externa aquosa e a presença e volume de uma fase de extração, o planejamento fatorial fracionado apresentou-se como uma ferramenta adequada, capaz de avaliar a influência destas variáveis sobre o rendimento, o tamanho de partícula, a polidispersão,

representada pelo valor de span, bem como a obtenção do máximo de encapsulação e teor de chalcona. Assim, um planejamento fatorial  $2^{5-1}$  com quatro pontos centrais foi construído, resultando em 20 diferentes formulações. Os resultados deste estudo de formulação são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos no estudo de caracterização das micropartículas obtidas usando delineamento fatorial  $2^{5-1}$ .

Experimento	Respostas				
	Rendimento (%)	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	Span	EE (%)	Teor (mg/100mg)
1	99,64	113,31	0,67	83,76	3,21
2	92,88	140,29	0,81	81,80	2,99
3	90,88	124,80	0,71	83,56	3,29
4	93,60	109,79	0,87	83,85	3,15
5	95,26	127,60	0,75	92,99	3,55
6	95,80	134,03	0,64	78,51	5,10
7	93,02	111,17	0,70	85,96	3,05
8	96,35	124,26	0,75	87,57	1,73
9	89,12	130,00	0,69	84,58	1,72
10	94,00	158,63	0,98	89,78	3,12
11	93,39	121,93	0,68	91,96	3,20
12	90,78	190,43	0,74	86,10	2,86
13	86,99	191,86	0,98	86,33	5,63
14	94,41	143,75	0,71	92,36	3,47
15	93,64	159,64	1,12	81,29	5,14
16	96,63	131,71	0,93	84,47	1,69
17	93,81	159,95	0,80	97,82	3,25
18	98,41	84,22	0,79	91,17	1,93
19	86,60	121,59	0,85	84,94	3,39
20	95,70	139,85	0,87	80,66	5,22

EE: Eficiência de encapsulação, Tamanho em  $\mu\text{m}$  do diâmetro da esfera (D[4,3])

Dois modelos são adequados para analisar os dados: ajustado para curvatura e não ajustado. O primeiro estima um termo de curvatura separado, enquanto o segundo tenta encaixar os pontos centrais usando um modelo de interação ([http://www.statease.com/dx8\\_man.html](http://www.statease.com/dx8_man.html)). O segundo tipo de modelo de regressão é utilizado quando os valores de curvatura e falta de ajuste são não significativos. Quando testes de curvatura aparecem como significativos, recomenda-se aumentar o planejamento para superfície de resposta, mais adequada a testes de predição.

Para a estimativa de significância do modelo, uma análise de variância (ANOVA) foi aplicada. Os modelos foram considerados significantes quando o valor de probabilidade de significância ( $p$ ) foi inferior a 0,05. A partir dos valores de  $p$ , representados na tabela 4, podemos concluir que os modelos foram significantes para todas as respostas.

O método de regressão por mínimos quadrados foi utilizado para a estimativa dos coeficientes da função polinomial (equação 1, item 2.2.2 de Materiais e Métodos). As equações resultantes para as respostas rendimento (Y1), tamanho de partícula (Y2), polidispersão (Y3), eficiência de encapsulação (Y4) e teor de QC2 (Y5) estão descritas abaixo.

$$Y1 (\%) = 93,54 + 0,91A - 0,50B + 0,55C - 2,14D - 1,70E - 1,40BD - 1,23CD$$

Equação 6

$$Y2 (\mu m) = 135,94 - 4,33A + 0,72B - 18,68C + 7,98D + 10,76E + 7,37AC - 6,52AE - 6,25DE$$

Equação 7

$$Y3 = 0,80 + 0,024A + 0,15B - 0,042C + 0,51D + 0,016E - 0,037BC + 0,040BD - 0,067CD - 0,047DE$$

Equação 8

$$Y4 (\%) = 86,16 - 0,036A - 2,59B + 0,037C + 0,39D + 0,64E - 1,31AB \\ - 1,41AC + 2,27BC + 1,58BE - 1,86CD$$

Equação 9

$$Y5 \left( \frac{mg}{100mg} \right) = 3,33 - 0,023A + 0,94B - 0,81C + 0,033D + 0,038E$$

Equação 10

Tabela 4. Termos do modelo significante, valores dos coeficientes de regressão e valores de  $p$  para as respostas rendimento, tamanho de partícula, polidispersão, eficiência de encapsulação e teor de QC2.

	Rendimento (2FI)		Tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ ) (2FI)		Span (2FI)		EE (2FI)		Teor (mg/100mg)	
	coeficiente	$p$	Coeficiente	$p$	coeficiente	$p$	coeficiente	$p$	coeficiente	$p$
Modelo	--	< 0.0001	--	0,0023	--	0,01	--	0,019	--	< 0.0001
Intercepto	93,54	--	195,94	--	0,80	--	86,47	--	3,33	--
A	0,91	0,0239	-4,33	0,2444	0,024	0,225	-0,036	0,959	-0,023	0,7262
B	-0,50	0,1769	0,72	0,8414	0,015	0,448	-2,59	0,005	0,94	< 0.0001
C	0,55	0,1401	-18,68	0,0003	-0,042	0,046	0,037	0,958	-0,81	< 0.0001
D	-2,14	< 0.0001	7,98	0,0447	0,051	0,020	0,39	0,584	0,033	0,6206
E	-1,70	0,0005	10,76	0,0110	0,016	0,396	0,64	0,373	0,038	0,5638
AB	--	--	--	--	--	--	-1,31	0,091	--	--
AC	--	--	7,37	0,0606	--	--	-1,41	0,072	--	--
AD	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
AE	--	--	-6,52	0,0914	--	--	--	--	--	--
BC	--	--	--	--	-0,037	0,073	2,27	0,010	--	--
BD	-1,40	0,0019	--	--	0,040	0,06	--	--	--	--
BE	--	--	--	--	--	--	1,58	0,048	--	--
CD	-1,23	0,0044	--	--	-0,067	0,0044	-1,86	0,026	--	--
DE	--	--	-6,25	0,1036	-0,047	0,03	--	--	--	--
Falta de ajuste	0,2721	--	0,8411	--	0,6843	--	0,3770	--	0,3888	--
$R^2$	0,9036	--	0,8335	--	0,8166	--	0,8561	--	0,9638	--
Adequação	14,918	--	11,005	--	8,794	--	8,800	--	25,949	--
Curvatura	0,8953	--	0,1290	--	0,4030	--	0,1157	--	0,1497	--

Para o planejamento fatorial fracionado foi utilizado o modelo de regressão não ajustado, o que inclui os pontos centrais na análise. Esse tipo de modelo de regressão é utilizado quando os valores de curvatura e falta de ajuste são não significativos e o modelo é significativo. Como pode ser visualizado na tabela 4, todos os quesitos foram atendidos, sendo assim este modelo de regressão foi considerado apropriado para predição e otimização de uma formulação a partir deste planejamento.

### 3.2 RENDIMENTO

O rendimento corresponde à relação entre a massa obtida de micropartículas no final do processo e a soma das massas de polímero e de chalcona utilizados no preparo de cada formulação. Como pode ser observado na tabela 3, os valores de rendimento variaram entre 86,6 e 99,6 %. Pela análise de variância apresentada na tabela 4 foi possível observar que o rendimento foi influenciado principalmente pelo volume de fase aquosa (fator D), volume de extração (fator E), bem como pelas interações entre os fatores B/D e C/D.

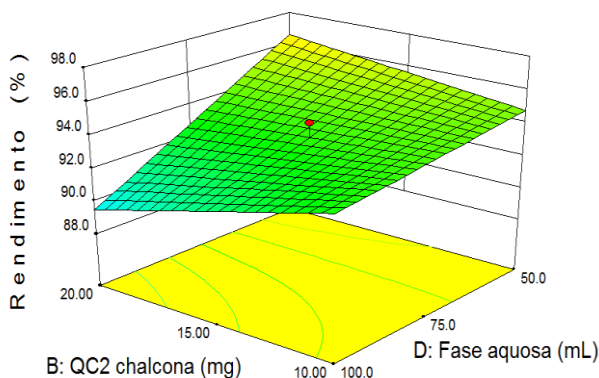


Figura 3. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o rendimento avaliando a interação dos fatores B e D, quantidade de chalcona  $\times$  volume da fase aquosa. Os demais termos encontram-se no nível central.

Na figura 3, que representa a interação entre os fatores B e D, quantidade de chalcona  $\times$  volume de fase aquosa, foi possível visualizar que o maior rendimento foi obtido em maior quantidade de chalcona (B)

para o menor volume de fase aquosa (D), sendo este último o fator com maior contribuição para esta resposta ( $p < 0.0001$ ).

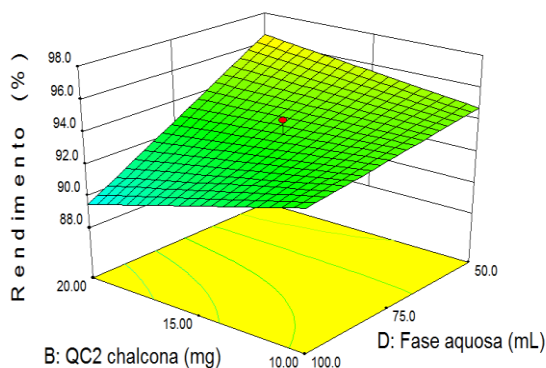


Figura 4. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o rendimento avaliando a interação dos fatores C e D, volume de fase orgânica  $\times$  volume de fase aquosa. Os demais termos encontram-se no nível central.

Para a interação CD, volume de fase orgânica  $\times$  volume de fase aquosa, demonstrada na figura 4, observou-se que o maior rendimento foi alcançado na condição de menor volume de fase aquosa (D) e maior volume de fase orgânica (C). Considerando a concentração constante da fase orgânica da emulsão, um maior volume desta fase representa uma maior quantidade de polímero na formulação.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO DE PARTÍCULA, DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E MORFOLOGIA DAS MICROPARTÍCULAS

Os resultados da determinação de tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica (inferida pelo valor de span) são apresentados na tabela 3.

O tamanho médio de partícula variou entre 84,22 e 191,86  $\mu\text{m}$ , e a análise de variância (tabela 4) indica que este parâmetro foi influenciado principalmente pelos fatores volume da fase orgânica (C) e fase de extração (E).

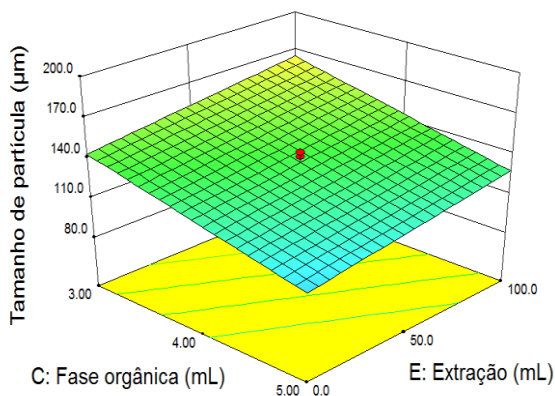


Figura 5. Gráfico tridimensional dos resultados obtidos para o tamanho de partícula a partir dos fatores C e E volume de fase orgânica  $\times$  fase de extração. Os demais fatores encontram-se no nível central.

No gráfico tridimensional apresentado na figura 5 foi possível observar que o tamanho de partícula foi influenciado principalmente pelo fator C ( $p=0,0003$ ). Quando avaliada a condição de menor volume de fase orgânica  $\times$  maior volume de fase de extração foram observados os maiores tamanhos de partícula.

O span relaciona os valores de diâmetro de partícula correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada para uma determinada amostra e um baixo valor de span indica uma estreita faixa de tamanhos. Os valores de span para todas as formulações variaram entre 0,64 e 1,12 (tabela 3) sendo influenciados principalmente pela interação entre os fatores C e D, volume de fase orgânica  $\times$  volume da fase aquosa ( $p=0,0044$ ).



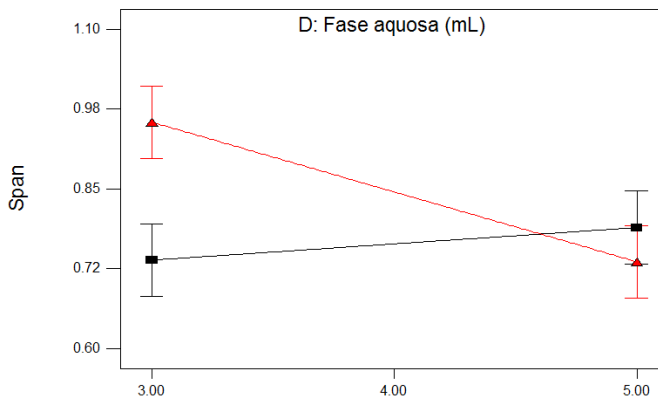


Figura 6. Gráfico de interação entre os fatores volume de fase orgânica e volume de fase aquosa (C e D) utilizados no preparo das micropartículas para a resposta Span (polidispersão). Fase aquosa: linha vermelha ( $\Delta$ ) 100 mL, linha preta ( $\bullet$ ) 50 mL.

A figura 6 demonstra que quanto maior for a razão entre os volumes de FO/FA, maior é a variação do tamanho das micropartículas. No entanto, mesmo havendo diferença estatisticamente significativa, as diversas formulações podem ser consideradas homogêneas quanto ao tamanho de partícula. Os baixos valores de span permitem afirmar que todas as formulações testadas apresentam uma baixa polidispersão.

Quanto à morfologia das micropartículas, foi observado que todas as formulações desenvolvidas formaram partículas esféricas de superfície lisa. A figura 7 é representativa de todos os sistemas microparticulados desenvolvidos no estudo de formulação.

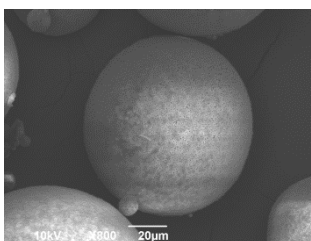


Figura 7. Micrografia representativa dos sistemas microparticulados desenvolvidos no estudo de formulação

### 3.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E TEOR DE CHALCONA

A eficiência de encapsulação é a razão percentual entre a quantidade de fármaco associado às micropartículas e a quantidade total usado na formulação (WISCHKE, SCHWENDEMAN, 2008). No caso da preparação de micropartículas pela técnica de evaporação do solvente a partir de uma emulsão, duas etapas são críticas, uma vez que podem levar a uma perda considerável de fármaco: *(i)* a etapa de evaporação do solvente, enquanto a partícula ainda não está sólida e pode ocorrer a difusão do fármaco para a fase contínua da emulsão e *(ii)* a etapa de lavagem para remoção dos resíduos de tensoativo, quando as moléculas que não estão efetivamente associadas ao sistema são eliminadas. Desta forma, o cálculo da eficiência de encapsulação envolve necessariamente o desenvolvimento de uma metodologia capaz de extrair quantitativamente o fármaco associado às micropartículas e quantificá-lo sem a interferência dos outros constituintes do sistema.

A dissolução das amostras em diclorometano e a posterior quantificação da QC2 nas soluções resultantes por espectrofotometria mostrou-se um método adequado para avaliar a eficiência de encapsulação nas formulações. Como demonstrado na figura 8, o método foi considerado específico para a quantificação da chalcona QC2, uma vez que as amostras brancas submetidas ao mesmo tratamento não apresentaram absorbância no comprimento de onda utilizado no estudo, 322 nm.

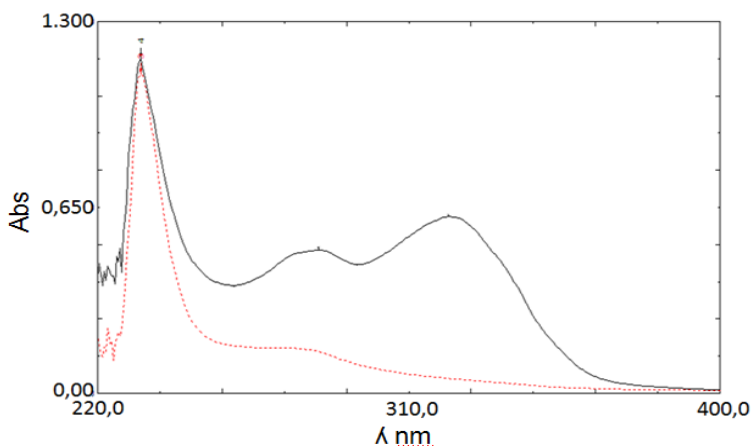


Figura 8. Espectro de absorção no UV. Linha tracejada MCP de PLGA brancas, linha contínua solução de QC2 em diclorometano 5,0 µg/mL.

Curvas de calibração de QC2 em diclorometano foram construídas em triplicata para avaliar a linearidade do método. A figura 9 exibe uma curva de calibração de QC2 em diclorometano, que foi linear na concentração de 0,5 a 5,0 µg/mL com coeficiente de correlação de 0,9999 ( $y=0,1093x+0,0064$ ).

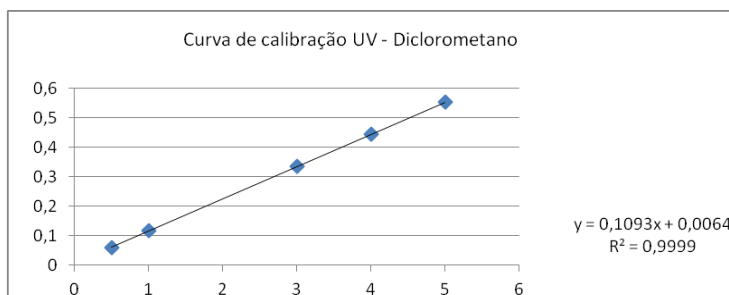


Figura 9. Curva de calibração da chalcona QC2 em diclorometano por espectrofotometria UV. Detecção a 322 nm.

A EE para todas as formulações variou entre 78,5 a 97,8 % (tabela 3). Estes altos valores podem ser atribuídos à lipofilicidade da

molécula QC2, que, devido a esta característica, apresenta uma maior afinidade pela fase orgânica em relação à fase aquosa. Assim, a difusão da substância ativa para o meio aquoso durante a etapa de solidificação é reduzida, favorecendo sua associação às micropartículas (HOMBREIRO-PÉREZ et al., 2003; FREIBERG; ZHU, 2004b; HOLGADO et al., 2008). A análise de variância apresentada na tabela 4 indica que as interações mais significativas sobre a eficiência de encapsulação foram BC, quantidade de chalcona  $\times$  volume de fase orgânica ( $p=0,010$ ), e CD, volume de fase orgânica  $\times$  volume de fase aquosa ( $p=0,026$ ).

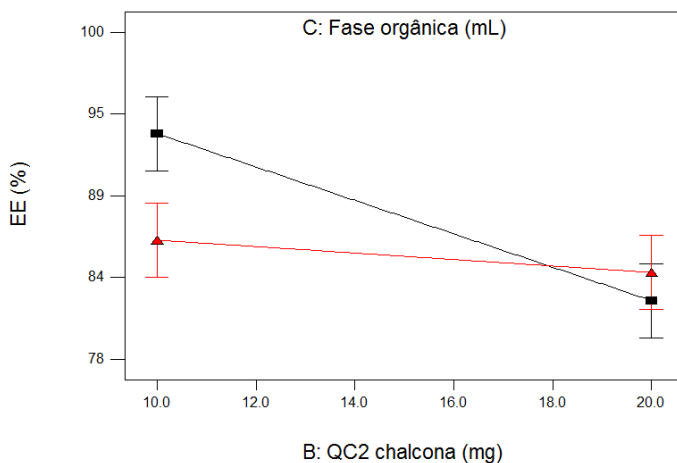


Figura 10. Gráfico de interação entre os fatores B e C, quantidade de chalcona  $\times$  volume de fase orgânica, para a avaliação da eficiência de encapsulação. Linha preta: 3 mL, linha vermelha: 5 mL de fase orgânica.

Como pode ser visualizada na figura 10, a EE é dependente do volume de fase orgânica. Ao avaliar a condição de menor volume de FO (3 mL) foi possível observar que a medida que aumenta a concentração de chalcona, reduz-se a EE. Este resultado pode indicar que a quantidade de chalcona adicionada na formulação excedeu a capacidade de encapsulação pelo polímero. Uma vez que EE representa um valor percentual de substância encapsulada sobre a quantidade inicial da substância ativa, quando o limite de encapsulação é atingido o valor de EE começa a baixar, refletindo a quantidade de chalcona livre que é eliminada durante a etapa de lavagem (MAO et al., 2007; DASHORA;

SARAF, 2007; CHOI et al., 2011; GAIGNAUX et al., 2012). Já para um maior volume de FO não foram observadas variações para a EE com o aumento da concentração de chalcona, o que reforça a suposição de haver excedido o limite de encapsulação do polímero discutida anteriormente.

Para a interação CD volume de fase orgânica  $\times$  volume de fase aquosa, o aumento da EE se deu com o aumento do volume de FA e redução do volume FO, sendo esta interação estatisticamente significativa (tabela 4).

Os altos valores de encapsulação observados podem ser atribuídos à baixa solubilidade da QC2 em meio aquoso, em conjunto com a técnica de extração do solvente pelo aumento da fase aquosa externa da emulsão. A extração favorece a partição do solvente, o que resulta na rápida formação de um filme polimérico sólido na camada mais externa da gotícula atuando como barreira de difusão para a substância ativa (FREITAS; MERKLE, GANDER, 2005).

O teor de QC2 nas micropartículas foi de 1,7 a 5,6 mg/100 mg. Pode-se observar, pela análise da tabela 4, que os fatores que mais influenciaram o teor foram a quantidade de chalcona e volume de fase orgânica.

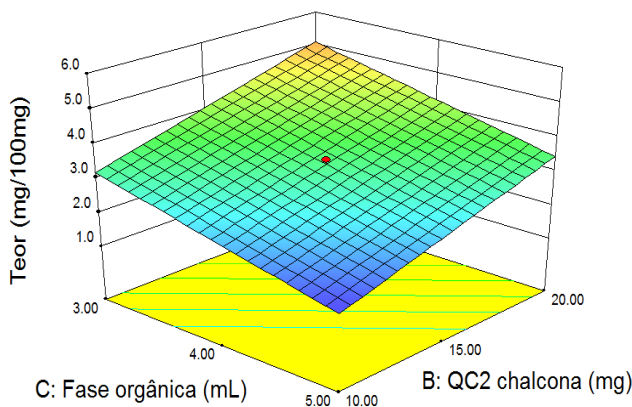


Figura 11. Gráfico tridimensional avaliando a interação entre os fatores quantidade de chalcona e volume de FO para a resposta teor de chalcona mg/100mg de micropartículas.

A figura 11 demonstra a interação entre os fatores B e C para a resposta teor. Como é possível observar a medida que aumenta a

concentração de chalcona e reduz o volume de FO maiores teores de QC2 são obtidos. Desta forma, quanto maior for o teor final, menor será a quantidade de micropartícula de PLGA necessária para veicular quantidade específica de QC2. Isto pode ser vantajoso, pois pode eliminar parte dos efeitos causados pelo uso de grandes quantidades de polímero (CHOI et al., 2011). Os demais fatores não foram estatisticamente significantes para esta resposta (tabela4).

### 3.5 OTIMIZAÇÃO A PARTIR DO ESTUDO DE FORMULAÇÃO

Para estabelecer as condições de obtenção de uma formulação otimizada a partir das respostas consideradas mais importantes neste estudo (tamanho de micropartículas, eficiência de encapsulação e teor de chalcona) foi utilizada a função desejabilidade, que combina os níveis de respostas dos fatores avaliando um equilíbrio favorável entre as mesmas. A desejabilidade pode variar de 0 a 1, sendo que os valores ótimos relacionados a cada resposta correspondem a 1 (DERRINGER, SUICH, 1980).

O objetivo principal da etapa de otimização para este trabalho foi encontrar a condição na qual tenhamos a maior concentração de chalcona em mg por 100 mg de micropartículas (teor) e com o máximo de EE. O ponto ótimo encontrado pela avaliação dos resultados experimentais foi caracterizado pelo valor de desejabilidade de 0,927 que demonstra o máximo de teor de chalcona sem prejuízo da EE. Dentro do campo experimental estudado, as melhores condições foram:

- concentração de PVA na fase aquosa da emulsão, 0,5 % m/m;
- volume de fase orgânica, 3 mL (concentração de polímero 100 mg/mL);
- volume da fase aquosa da emulsão, 100 mL;
- volume da fase de extração, 100 mL.

A tabela 5 demonstra a comparação entre os valores preditos e obtidos experimentalmente, sendo possível visualizar uma grande similaridade entre as resposta preditas pelos modelos matemáticos e as respostas obtidas experimentalmente, com inferiores a 10 %.

Tabela 5. Comparação entre valores preditos e obtidos experimentalmente no processo de otimização

Otimização	Tamanho	EE	Teor
Predito	186,0	85,7	5,2
Obtido experimentalmente	191,9	86,3	5,6
Varição (%)	+ 3,17	+ 0,70	+ 7,69

Respostas: Tamanho ( $\mu\text{m}$ ), EE eficiência de encapsulação em porcentagem e teor (mg/100mg).

Na figura 12 foi possível observar que a tendência (tons avermelhados do gráfico) de aumento do teor ocorre na condição de maior quantidade de chalcona e reduzido volume de FO. Devido à influência positiva observada para o fator concentração de chalcona, optou-se por avaliá-lo em concentrações maiores. Para confirmação desta hipótese foram mantidos os demais fatores já otimizados, aumentado apenas a concentração de chalcona na formulação para (25, 30 e 35 mg). Os demais fatores de formulação e materiais foram aqueles anteriormente descritos.

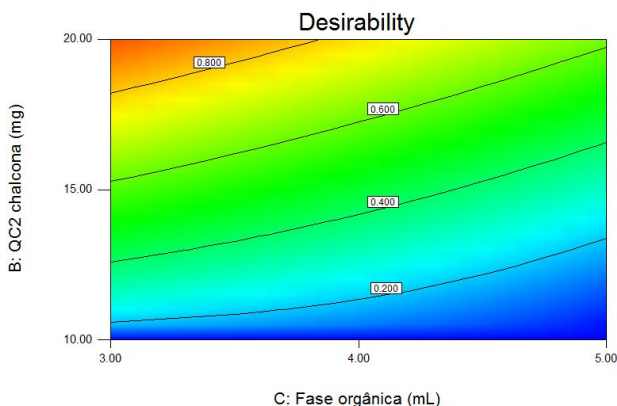


Figura 12. Representação gráfica da desejabilidade entre montante de chalcona e volume de fase orgânica. Demais condições: 0,5 % de PVA, 3 mL de FO, 100 mL de FA, 100 mL de fase de extração.

Como é possível observar na tabela 6, com o aumento da concentração de chalcona houve um acréscimo na EE até o limite de 30 mg de QC2 em 3 mL de fase orgânica. No entanto, nas formulações preparada com 35 mg de QC2 foi observada uma redução na EE, o que pode estar relacionado à saturação do sistema microparticulado.

Tabela 6. Avaliação do sistema otimizado com o aumento da concentração de chalcona para as respostas EE e teor

QC2 (mg)	Rendimento	EE	Teor (mg/100mg)
25	94,84 $\pm$ 1,50	92,75 $\pm$ 0,16	9,18 $\pm$ 0,16
30	93,50 $\pm$ 2,55	96,90 $\pm$ 1,97	9,59 $\pm$ 1,97
35	90,12 $\pm$ 2,67	89,11 $\pm$ 1,76	9,36 $\pm$ 1,76

Conforme análise de variância, o valor de  $F_{\text{calc}}$  para EE foi de 14,90 e o  $F_{\text{cte}}$  de 5,15. Com este resultado foi possível inferir que a concentração de chalcona apresenta diferença estatística para esta resposta ( $p = 0,005$ ). Com relação ao teor, não foram observadas diferenças significativas ( $F_{\text{calc}} = 4,0$ ;  $F_{\text{cte}} = 5,15$ ).

Sendo assim, o sistema microparticulado otimizado foi definido com a seguinte composição: 30 mg de chalcona, 100 mL de FA a 0,5% de PVA, 3 mL de FO (300 mg de PLGA) e 100 mL de fase de extração.



## ***CAPÍTULO 2***

---

***Desenvolvimento e avaliação dos sistemas microparticulados a partir  
da formulação otimizada.***



## 1. INTRODUÇÃO

O desafio que representa o desenvolvimento de novos sistemas de liberação modificada de fármacos tem estimulado inúmeros investimentos na investigação científica na área de tecnologia farmacêutica nas últimas décadas.

A microencapsulação é um método bem estabelecido para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada ou prolongada. Estes sistemas apresentam inúmeras vantagens em relação aos sistemas unitários, entre as quais se podem citar a distribuição rápida e uniforme pelo trato gastrointestinal, melhor efeito terapêutico, menor variação na biodisponibilidade, possibilidade de fracionamento e ajuste de dose (KIM, et al., 2005; GERWIN; HOPS; LUCKE, 2006). Todas estas vantagens tornam estes sistemas particularmente interessantes para o tratamento de patologias crônicas, uma vez que podem contribuir consideravelmente com a melhora da qualidade de vida destes pacientes.

No estudo realizado para avaliar a potencial atividade de chalconas no tratamento do diabetes melito, além da chalcona QC2, já amplamente discutida no capítulo 1, outras chalconas da série 2 quilonil chalcona . Nestes estudos, realizados por Pereira e colaboradores (2011), também apresentou uma atividade relevante a chalcona QC10, que demonstrou uma atividade de secreção tardia da insulina, aumentando a secreção de insulina em 164 % após 60 minutos, em relação ao grupo controle hiperglicêmico, além de promover a redução da atividade da enzima maltase, atividades não evidenciadas para a chalcona QC2. No entanto, ambas chalconas promovem incremento do glicogênio hepático e muscular reduzindo a glicemia.

Assim, um novo estudo envolvendo estas duas chalconas, QC2 e QC10, foi planejado, utilizando como ponto de partida a formulação otimizada no estudo de formulação descrito no capítulo 1. Como uma alternativa para desenvolvimento de uma formulação de menor custo e com características de liberação controlada foi utilizado o polímero Eudragit® RS100.

O Eudragit® RS100 é um copolímero de poli(etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetil amônio etil-metacrilato) que contém uma baixa concentração de grupos de amônio quaternário (4,5 a 6,8%) (HAZNEDAR, DORTUNÇ, 2004). Os grupos amônio conferem ao polímero características hidrofílicas, aumentando a permeabilidade do

polímero, proporcionando baixa permeabilidade, permitindo a produção de formulações de liberação sustentada (ESPOSITO et al., 2002), porém com características de liberação mais rápidas quando comparadas com o PLGA.

Este capítulo trata da preparação e caracterização de sistemas microparticulados preparados utilizando os polímeros Eudragit® RS100 e PLGA e as chalconas QC2 e QC10. Inicialmente são descritas as condições de preparo dos sistemas microparticulados e, a seguir, a caracterização dos mesmos quanto ao tamanho, polidispersão, morfologia, além da avaliação da pureza, fusão e compatibilidade entre os componentes da formulação e grau de cristalinidade das amostras. Um estudo do comportamento de liberação apresentado pelas micropartículas *in vitro* foi realizado. Por fim, a atividade anti-hiperglicêmica *in vivo* das chalconas microencapsuladas foi avaliada em modelos de ratos hiperglicêmicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Matérias – primas

Ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA, 50:50) Resomer<sup>®</sup> 503 - Boehringer Ingelheim

Eudragit<sup>®</sup> RS100 poli(etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetil amônio etil metacrilato) 1:2:0:1

6-quinolinachalcona-(2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(6-quinolinil)-2-propen-1-ona (chalcona QC2) Massa molar 273,32 g/mol.

6-quinolina N-óxidochalconas-(2E)- 1-(4-Metil-fenil)-3-(1-óxido-6-quinolinil)-2-propen-1-ona (chalcona QC10). Massa molar 289,33 g/mol.

#### 2.1.2 Solventes, soluções e reagentes

Água ultra pura Milli-Q

Água purificada

Álcool polivinílico - PVA (Molviol 40-88 Sigma–Aldrich)

Diclorometano P.A. (Qhemis)

Glicose PP (Gold Analisa Diagnóstica LTDA)

Fosfato de sódio dibásico P.A (Vetec Química Fina)

Fosfato de sódio monobásico anidro P.A (NUCLEAR)

Laurilsulfato de sódio (Vetec Química Fina)

#### 2.1.3 Aparelhos e equipamentos

Agitador magnético ARE Heating Magnetic Stirrer VELP Scientifica

Aparelho de hidrodestilação FABBE

Balança Ohaus Analytical Standard

Banho de Ultrassom – UltraSonicCleaner USC 700 Unique

Bomba de vácuo

Calorímetro exploratório diferencial DSC-50 (Shimadzu)

Centrífuga Sigma 4K15

Coluna C8 (5 µm, 250 x 4,6 mm) Perkin Elmer

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer, equipado com:

Auto sampler Perkin Elmer Series 200

Bomba binária Series 200

Degasser à vácuo Perkin Elmer Series 200

Detector UV/Vis Series 200

Interface 600 Series LINK

Difratômetro à laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments)

Difratômetro de raio-XX'Pert PRO (PANalytical) equipado com detector X'Celerator

Espectrofotômetro Shimadzu UV/Vis 2000 (Shimadzu)

Espectrofotômetro GBC Scientific Equipment Pty LTDA

Freezer Consul 180

Liofilizador Terroni LD 1500

Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM – 6390LV (Jeol Ltda.)

pHmetro Oakton, pH 5 Acorn series

Recobridora a vácuo Leica EM SCD500 (Leica Microsystems)

## 2.2 MÉTODOS

### **Obtenção das amostras**

As chalconas 6-quinolinachalcona - (2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(6-quinolinil)-2-propen-1-ona (chalcona QC2) e 6-quinolina N-óxido chalconas-(2E)-1-(4-Metil-fenil)-3-(1-óxido-6-quinolinil)-2-propen-1-ona (chalcona QC10) foram sintetizadas e cedidas pela equipe do Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti do Departamento de Química desta Universidade.

### **2.2.1 Preparação das micropartículas contendo as chalconas QC2 e QC10**

As micropartículas foram preparadas pela técnica de emulsão o/a com extração do solvente, adaptado de Wischke e colaboradores (2008). Os parâmetros de formulação, tanto no que diz respeito à composição como à técnica de preparação, foram estabelecidos de acordo com a formulação otimizada a partir do estudo de formulação descrito no capítulo 1. Para a obtenção da fase orgânica (FO), 300 mg dos polímeros (PLGA 503 ou Eudragit®RS100) e 30 mg das chalconas (QC2 ou QC10) foram solubilizados em 3 mL de diclorometano com auxílio de banho de ultrassom. Esta solução foi transferida para um béquer contendo 100 mL da solução de PVA 0,5% (m/m) (fase aquosa da emulsão, FA) sob agitação magnética de 750 rpm, obtendo assim a emulsão o/a. Três minutos após a formação da emulsão, foram adicionados 100 mL da solução de PVA 0,1% (fase de extração, FE), para induzir a extração do solvente. As demais operações foram conduzidas conforme metodologia descrita no item 2.2.1 do capítulo 1.

### **2.2.2 Validação da metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A metodologia analítica foi validada segundo os critérios propostos pelo ICH (International Conference on Harmonization of Thechemical Requirements for Registration of Human Use) de 2005 e a resolução da ANVISA RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

#### **Sistema Cromatográfico.**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Perkin Elmer equipado com detector UV/Vis ajustado em 322 nm para a molécula QC2 e 306 nm para QC10. Os experimentos foram executados em coluna Perkin Elmer C<sub>8</sub> de fase reversa (5 µm, 250 x 4,6 mm) adaptada a uma pré-coluna Phenomenex ODS (4,0 x 3,0 mm). O sistema foi operado isocraticamente a 25 °C utilizando como fase móvel metanol:água (80:20 V/V) para os sistemas contendo o polímero Eudragit®RS100 e solução metanólica de NaOH 0,1 N:água (80:20 V/V) para os sistemas a base de PLGA 503.

A fase móvel para os diferentes sistemas foi preparada diariamente, filtrada em membrana PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) de diâmetro de poro de 0,45 µm e desgaseificada em banho de ultrassom por 10 minutos antes do uso. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção de 10µL. As amostras foram injetadas no cromatógrafo por um injetor automático e a aquisição dos dados foi obtida utilizando o software TotalChrom®.

#### **Curva analítica, linearidade e intervalo**

Para a obtenção das curvas analíticas foram preparadas soluções de QC2 e QC10 nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 16,0; 20,0; 24,0; 30,0 e 40,0 µg/mL. As soluções foram filtradas através de membranas de PVDF de diâmetro de poro de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo por um injetor automático.

As áreas dos picos foram representadas frente às concentrações para a construção da curva. A equação da reta foi obtida por regressão



linear e o coeficiente de correlação calculado. Para que a curva seja considerada linear o coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser  $r \geq 0,99$  (BRASIL, 2003).

### **Especificidade do método**

A especificidade do método foi avaliada através da análise comparativa de cromatogramas obtidos com micropartículas brancas solubilizadas em metanol ou solução metanólica de NaOH 0,1N com aqueles obtidos com soluções das chalconas QC2 ou QC10. Para o método ser considerado específico nenhum dos demais componentes presentes na formulação (diferentes polímeros PLGA ou Eudragit® RS100) devem eluir com o mesmo tempo de retenção das substâncias ativas.

### **Precisão e exatidão (E)**

A precisão e a exatidão do método analítico foram determinadas por análises inter-dia.

A precisão consiste na habilidade do método em reproduzir o mesmo resultado independente do intervalo entre as análises. Para isso foram realizados os seguintes testes:

*Precisão intermediária:* expressa a precisão em diferentes dias. Na validação dos métodos em questão as concentrações 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL foram injetadas três vezes em três dias diferentes. O desvio padrão relativo foi calculado, não devendo ser maior do que 5,0 % (BRASIL, 2003).

*Repetibilidade:* expressa a precisão sob as mesmas condições de operação num curto período de tempo. Na validação do método acima descrito, a concentração teste de 20,0 µg/mL foi injetada seis vezes no mesmo dia. Desta forma foi possível calcular o desvio padrão relativo, não devendo este ser maior do que 5,0 % (BRASIL, 2003).

A exatidão (equação 11) consiste na concordância entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro (% de recuperação) (BRASIL, 2003). A porcentagem de recuperação deve ficar entre 95 – 105 %.

$$\text{Exatidão} = \left( \frac{\text{conc. obtida} - \text{conc. real}}{\text{conc. real}} \right) \times 100$$

Equação 11

### **Limite de quantificação (LQ)**

Consiste na menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ foi determinado conforme a equação 12.

$$LQ = \frac{dp \times 10}{S}$$

Equação 12

onde: dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; S é média da inclinação da curva analítica; 10 é utilizado com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base.

### **Limite de detecção (LD)**

Consiste na menor concentração do analito que produz resposta considerada detectável. Normalmente é avaliada pela relação sinal:ruído, em uma proporção 3,3:1. O LD foi determinado conforme equação 13.

$$LD = \frac{dp \times 3,3}{S}$$

Equação 13

onde: dp é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; S é a média da inclinação da curva analítica; 3,3 é utilizado com base na relação de 3,3 vezes o ruído da linha de base.

### 2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) e teor de chalconas nos sistemas microparticulados

Cerca de 10 mg de micropartículas foram exatamente pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10,0 mL. Dependendo do sistema microparticulado o volume foi completado com metanol (micropartículas de Eudragit®) ou solução metanólica de NaOH 0,1N (micropartículas de PLGA). As misturas foram mantidas em agitação magnética por um período de 2 horas até a completa solubilização dos polímeros e das chalconas. As alíquotas foram filtradas através de membranas de PVDF de diâmetro de poro de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo. Para o cálculo de EE procedeu-se à correção das áreas em função da diluição. Os valores das áreas foram substituídos na equação da reta obtida por CLAE e, desta forma, foi determinada a massa de chalcona encapsulada em relação à massa total de chalcona utilizada em cada formulação, conforme descrito na equação 14.

$$EE\% = \left( \frac{\text{massa de chalcona encapsulada (mg)}}{\text{massa total de chalcona utilizada (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 14

O teor de chalcona para cada formulação foi expresso como mg de chalcona por 100 mg de micropartículas, conforme descrito na equação 15.

$$\text{Teor} = \left( \frac{\text{massa de chalcona encapsulada (mg)}}{\text{massa de micropartículas (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 15

### 2.2.4 Caracterização físico-química dos sistemas microparticulados

#### Rendimento

O rendimento foi calculado com base na massa obtida de micropartículas para cada formulação em relação à quantidade total de polímero e chalcona utilizada no preparo das mesmas. O resultado foi apresentado em porcentagem, conforme equação 16.

$$\text{Rendimento} = \left( \frac{\text{micropartículas (mg)}}{\text{polímero} + \text{chalcona (mg)}} \right) \times 100$$

Equação 16

### **Diâmetro médio e distribuição granulométrica**

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das micropartículas foram avaliados por difração a laser em equipamento Mastersizer 2000 Hydro, com luz monocromática vermelha de um laser de HeNe. Para a realização destas análises as amostras foram dispersas em água destilada com auxílio de ultrassom.

A distribuição granulométrica foi referida como span, calculada conforme a equação 17.

$$\text{Span} = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}}$$

Equação 17

### **Morfologia das micropartículas**

As formulações de micropartículas foram analisadas quanto à formação e morfologia por MEV. As amostras foram metalizadas em ouro e analisadas nos aumentos de 20 a 400 vezes, em microscópio eletrônico de varredura, disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

#### **2.2.5 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)**

As análises termogravimétricas foram obtidas em célula TGA-50 sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min em cadinho de platina contendo massas das chalconas de aproximadamente 3 mg.

As análises por calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em equipamento DSC 60 (Shimadzu), equipado com controlador de fluxo para gás de purga (N<sub>2</sub>) FC-60, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Para realizar as análises, a exatamente cerca de 2 mg das amostras ou matérias-primas foram transferidos para cadinhos de alumínio, os quais foram selados e colocados no forno do calorímetro exploratório. As análises foram conduzidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/ min) com razão de aquecimento de 10 °C/min.

### **2.2.6 Análise de difração de Raio-X**

As amostras e matérias-primas foram colocadas em um porta amostra e analisadas a temperatura ambiente nos ângulos ( $2\theta$ ) de 3° a 60° com passo de 0,03° em tempo de 1 segundo utilizando um difratômetro de raios-X equipado com detector X'Celerator. Para a emissão de raios-X foi utilizado ânodo de cobre, que emite radiação  $K\alpha$ , com comprimento de 1,5418 Å, fluxo definido pela voltagem de 45 kV e intensidade de 40 mA.

### **2.2.7 Avaliação do perfil de liberação dos sistemas microparticulados**

#### **Preparação das curvas analíticas das chalconas QC2 e QC10 no meio de dissolução**

O preparo das curvas analíticas foi conduzido conforme descrito no item “Curva analítica, linearidade e intervalo” utilizando como solvente para as diluições uma solução de tampão fosfato pH 7,4 (100 mM) contendo 0,5 % de lauril sulfato de sódio.

#### **Avaliação da solubilidade das chalconas QC2 e QC10 no meio de dissolução**

A solubilidade das chalconas QC2 e QC10 em tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,5 % de lauril sulfato de sódio foi estimada. Para isso, dez mililitros do meio e um excesso das chalconas foram transferidos a um frasco âmbar, obtendo assim uma suspensão. As suspensões foram mantidas aquecidas a 37 °C em banho-maria sob agitação magnética a 150 rpm por 24 horas. O conteúdo do frasco foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado imediatamente em filtro de membrana PVDF 0,45 µm. Os filtrados foram injetados diretamente no cromatógrafo. As áreas obtidas foram substituídas na

equação da reta, previamente determinada. Este procedimento foi realizado em triplicata.

### **Ensaio de liberação**

A liberação das chalconas a partir dos sistemas microparticulado em solução de tampão fosfato (100 mM) contendo 0,5 % de lauril sulfato de sódio foi avaliada. Inicialmente, 50 mg de cada uma das amostras micropartículas, Eudragit/QC2, Eudragit/QC10, PLGA/QC2 e PLGA/QC10, foram pesadas em triplicata e transferidos para frascos contendo 150,0 mL do meio de liberação, sendo mantidos a  $37 \pm 0,5$  °C com agitação magnética constante de 150 rpm. Alíquotas de 5mL foram coletadas em intervalos pré-determinados de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 12,0 e 24 horas, com a reposição do meio de dissolução em igual volume. As alíquotas coletadas foram filtradas através de membrana de PVDF de diâmetro de poro de 0,45  $\mu$ m e injetadas no cromatógrafo. A partir dos resultados, gráficos da porcentagem de chalcona liberada em função do tempo foram construídos.

#### **2.2.8 Estudos *in vivo***

##### **Animais**

Ratos *Wistar* machos adultos entre 48–50 dias de idade (180–250g), foram mantidos em gaiolas plásticas com alimento e água a vontade até o início dos experimentos em biotério exclusivo. A temperatura da sala foi mantida entre  $21 \pm 2$  °C e com ciclo de 12 h claro/12 h escuro. Animais descritos como jejum, foram privados de comida por 16 horas, mas com acesso livre à água. Os animais foram mantidos de acordo com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal avaliado pela CEUA/UFSC.

##### **Curva de Tolerância à Glicose – CTG**

Para a construção da curva de Tolerância à Glicose foi induzida a hiperglicemia em ratos *Wistar* após 16 horas de jejum. Os animais hiperglicêmicos receberam 4 g/Kg (8,9 M) de glicose por via oral (v.o.). Para cada experimento, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: hiperglicêmico, hiperglicêmico tratado com chalconas QC2 ou QC10 nas concentrações de (5 e 15 mg/Kg) v.o., hiperglicêmico

tratado com micropartículas poliméricas (Eudragit® RS100 ou PLGA 503) contendo chalconas QC2 ou QC10 nas concentrações de (5 e 15 mg/Kg) v.o. Os níveis de glicose no sangue foram avaliados nos tempos zero, 30 e 180 min. No tempo de 180 minutos foi realizada uma nova sobrecarga de glicose 4 g/Kg (8,9M) continuando as coletas nos tempos, 210 e 360 min.

### **Avaliação da glicemia**

O sangue foi coletado com uma seringa pela veia caudal dos animais anestesiados e transferidos para tubos tipo eppendorf. As amostras foram centrifugadas e imediatamente o soro foi separado. Alíquotas de 10 µl do soro (em duplicata) foram utilizadas para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (GLICOSE PP da Gold Analisa Diagnóstica). As amostras foram incubadas por 10 minutos a 37 °C e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL de glicose. Após o término do experimento, os animais foram anestesiados e decapitados em guilhotina.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS MICROPARTICULADOS DE PLGA OU EUDRAGIT® RS100 CONTENDO CHALCONAS QC2 OU QC10

A partir da formulação otimizada descrita no capítulo 1 foi proposto o desenvolvimento de novos sistemas microestruturados incluindo o polímero Eudragit® RS100 e a molécula chalcona QC10, a qual se diferencia estruturalmente da chalcona QC2 por apresentar um nitrogênio no anel quinolínico oxidado (figura 13).

Os sistemas foram identificados levando em conta o tipo de polímero utilizado e a molécula a ser encapsulada: PLGA/QC2, PLGA/QC10, Eudragit/QC2 e Eudragit/QC10.

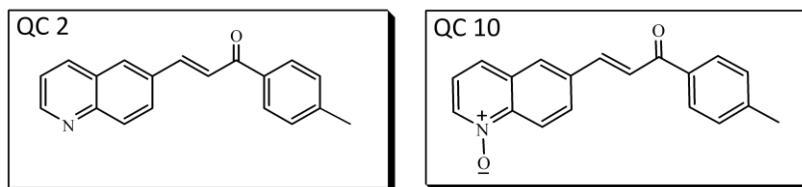


Figura 13. Estrutura química das chalconas QC2 e QC10.

##### 3.1.1 Desenvolvimento e validação da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência CLAE para os sistemas microparticulados

O desenvolvimento de um método analítico envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência ou desempenho com evidências objetivas. Esse processo costuma ser denominado de validação (BRITO et al., 2003). A validação de um método analítico é o processo que estabelece, através de estudos laboratoriais, que este procedimento é adequado para a aplicação pretendida assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Todo método para a determinação quantitativa de um analito deve ser validado, a fim de garantir com segurança os resultados de doseamento. Para isso, a metodologia deve apresentar especificidade, linearidade, precisão, além de um limite de detecção e de quantificação



adequados para a análise em questão. Em se tratando de CLAE, as características de tempo de retenção e simetria de picos são fundamentais. Sendo assim, para a obtenção das melhores condições cromatográficas, a proporção da fase móvel e fluxo foram otimizados para melhor resolução do pico e sensibilidade adequada dos métodos.

Para a validação analítica, micropartículas brancas dos polímeros PLGA 503 e Eudragit® RS100 foram preparadas conforme método descrito no item 2.2.2 sem a adição das chalconas.

Devido às particularidades de composição de cada um dos sistemas, foi necessário desenvolver quatro métodos cromatográficos (tabela 7). Para a avaliação das micropartículas preparadas com o polímero Eudragit® RS100, a validação analítica foi conduzida utilizando metanol grau HPLC, solvente capaz de extrair completamente as chalconas encapsuladas do sistema. Nas micropartículas de PLGA, a extração das chalconas foi realizada por digestão do polímero utilizando uma solução metanólica de NaOH 0,1 N (BENNY et al., 2009).

Tabela 7. Parâmetros dos métodos cromatográficos e programação de fase móvel para CLAE. Fase móvel: solvente A: Metanol ou solução metanólica de NaOH 0,1 N; solvente B: água ultrapura.

Métodos	TR (min.)	Fluxo (mL/min)	Fase móvel	
			A (%)	B (%)
Metanol QC2	7,5	0,8	80	20
Metanol QC10	5,0	0,8	80	20
Sol. metanólica de NaOH 0,1N QC2	7,0	0,8	80	20
Sol. metanólica de NaOH 0,1N QC10	7,5	0,8	80	20

TR: tempo de retenção

### Especificidade

A especificidade é a habilidade do método em determinar com exatidão o composto de interesse na presença dos demais componentes da formulação (ICH, 2005). Este parâmetro foi comprovado através da comparação entre os cromatogramas das amostras de solução das chalconas e os das micropartículas brancas.

A figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos no estudo de especificidade, na qual é possível constatar que os componentes de formulação polímero e PVA não interferiram na detecção das chalconas QC2 e QC10 avaliadas frente aos polímeros PLGA 503 e Eudragit® RS100, sendo o método considerado específico.

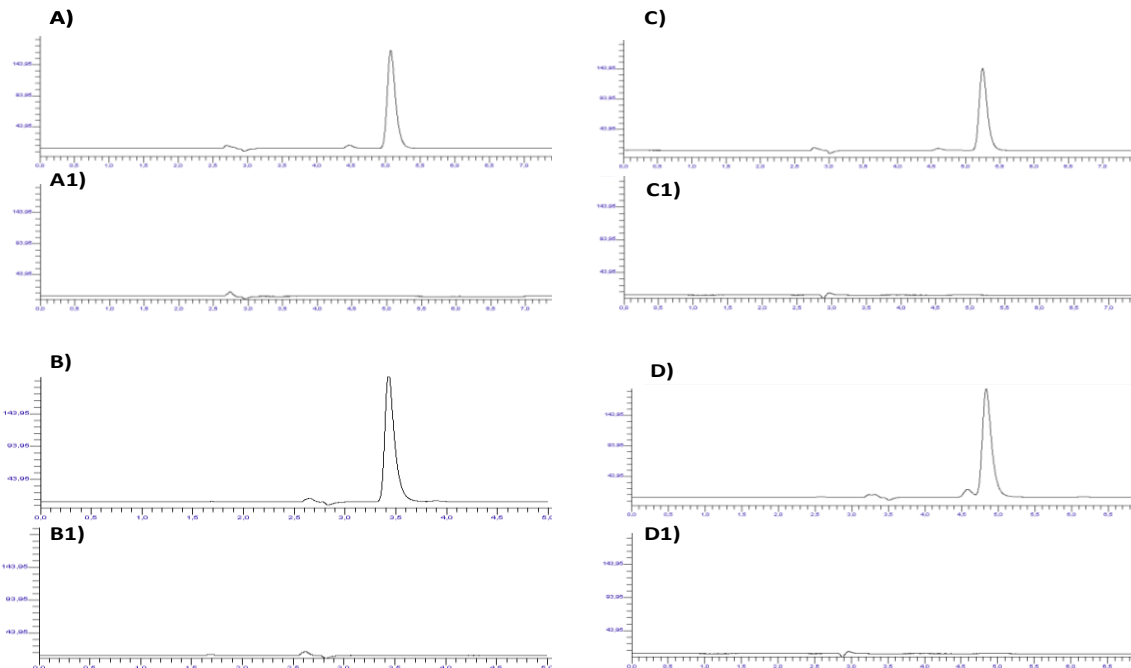


Figura 14. Cromatogramas da especificidade do método por CLAE. (A) solução de QC2 20 µg/mL em metanol; (B) solução de QC10 20 µg/mL em metanol; (A1 e B1) micropartículas brancas de Eudragit<sup>®</sup> RS100; (C) solução de QC2 20 µg/mL em solução metanólica de NaOH 0,1N; (D) solução de QC10 20 µg/mL em solução metanólica de NaOH 0,1 N e (C1 e D1) micropartículas brancas de PLGA 503.

## Linearidade e intervalo

Um método analítico deve apresentar a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais em uma determinada faixa de concentração do analito dentro de um intervalo especificado. O intervalo é a faixa entre os níveis superiores e inferiores do analito que são determinados com precisão, exatidão e linearidade utilizando o método desenvolvido. Esta avaliação é realizada através da elaboração de uma curva padrão e da análise estatística da linearidade através da regressão linear (BRASIL, 2003).

A linearidade dos métodos foi avaliada no intervalo de 2-40 µg/mL para cada uma das amostras em triplicata. As tabelas 8 e 9 apresentam as equações de reta e os fatores de correlação para QC2 e QC10, respectivamente. Para que uma reta seja considerada linear, o fator de correlação deve ser igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003), e os valores obtidos, superiores a 0,999, indicam uma ótima correlação entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos e as concentrações nos intervalos avaliados. Os métodos desenvolvidos apresentaram linearidade no intervalo investigado.

Tabela 8. Resultados obtidos na análise da linearidade para a chalcona QC2 pelo método de CLAE.

Chalcona QC2	Intervalo (µg/mL)	Equação da reta	r
Metanol	2 - 40	$y = 67630x + 18099$	0,999
Sol. metanólica de NaOH 0,1N	2 - 40	$y = 53878x + 27342$	0,999

Tabela 9. Resultados obtidos na análise de linearidade para chalcona QC10 pelo do método de CLAE.

Chalcona QC10	Intervalo ( $\mu\text{g/mL}$ )	Equação da reta	r
Metanol	2 - 40	$y = 83887x + 26038$	0,999
Sol. metanólica de NaOH 0,1N	2 - 40	$y = 67410x + 27086$	0,999

## Precisão

A precisão é o parâmetro que traduz a habilidade do método em reproduzir resultados em concordância quando o mesmo é aplicado a múltiplas análises de uma mesma amostra, e pode ser inferida por meio da determinação da precisão intermediária e da repetibilidade.

Na precisão intermediária, que representa a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise, as chalconas QC2 e QC10 foram avaliadas nas concentrações teóricas de 16, 20 e 24  $\mu\text{g/mL}$ . As amostras foram injetadas no cromatógrafo três vezes em três dias diferentes, respeitando o intervalo de dois dias entre as análises. Os resultados de precisão intermediária referente às metodologias desenvolvidas para micropartículas de PLGA 503 e Eudragit® RS100 estão dispostos nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Resultados obtidos na análise de precisão intermediária referente às concentrações teóricas (a) 16  $\mu\text{g/mL}$ , (b) 20  $\mu\text{g/mL}$  e (c) 24  $\mu\text{g/mL}$ , para avaliação das micropartículas preparadas com Eudragit® RS100.

	Metanol QC2			Metanol QC10		
	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)
1a	15,58 $\pm$ 0,33			15,75 $\pm$ 0,84		
2a	16,13 $\pm$ 2,39	15,89	1,96	15,71 $\pm$ 1,72	15,73	1,04
3a	15,95 $\pm$ 0,18			15,74 $\pm$ 0,78		
1b	19,50 $\pm$ 1,67			19,75 $\pm$ 0,78		
2b	19,94 $\pm$ 2,76	19,75	1,93	19,45 $\pm$ 0,27	19,75	2,18
3b	19,82 $\pm$ 0,66			20,06 $\pm$ 3,28		
1c	23,61 $\pm$ 1,66			24,17 $\pm$ 4,00		
2c	23,86 $\pm$ 2,19	23,70	1,49	23,33 $\pm$ 0,51	23,77	2,64
3c	23,64 $\pm$ 0,46			23,82 $\pm$ 1,26		

Tabela 11. Resultados obtidos na análise de precisão intermediária referente às concentrações teóricas (a) 16 µg/mL, (b) 20 µg/mL e (c) 24 µg/mL, para avaliação das micropartículas preparadas com PLGA 503.

	Sol. metanólica NaOH 0,1 N QC2			Sol. metanólica NaOH 0,1N QC10		
	Conc. (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1a	16,07 ± 0,65	16,03	1,90	15,47 ± 1,51	15,97	2,82
2a	15,66 ± 1,07			16,26 ± 0,81		
3a	16,28 ± 2,25			16,20 ± 2,43		
1b	20,56 ± 0,38	20,04	2,40	19,44 ± 1,11	19,94	2,34
2b	19,57 ± 1,84			20,26 ± 0,77		
3b	19,78 ± 1,96			20,13 ± 2,32		
1c	24,75 ± 0,18	23,88	2,64	20,13 ± 2,32	23,74	1,71
2c	23,70 ± 1,86			24,32 ± 0,48		
3c	23,78 ± 1,76			24,09 ± 1,69		

A repetibilidade expressa a concordância entre os resultados sob as mesmas condições de operação num curto período de tempo. Na validação dos métodos em questão, a concentração teste de 20 µg/mL foi injetada seis vezes no mesmo dia. Os resultados da repetibilidade referente às metodologias desenvolvidas para micropartículas de Eudragit® RS100 e PLGA 503 estão demonstrados nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Os resultados de desvio padrão relativo (DPR) para as amostras usadas foram inferiores a 1,0 % nos dois níveis avaliados, estando de acordo com o preconizado para este parâmetro, que admite uma variação máxima de 5,0 %.

Tabela 12. Dados de repetibilidade na concentração teórica de 20 µg/mL para avaliação das micropartículas desenvolvidas com Eudragit® RS100.

	Metanol QC2			Metanol QC10		
	Conc. (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1	20,00	19,94	0,22	20,10	19,93	0,50
2	19,96			19,92		
3	19,91			19,87		
4	19,98			19,83		
5	19,92			19,98		
6	19,94			19,87		

Tabela 13. Dados de repetibilidade na concentração teórica de 20 µg/mL para avaliação das micropartículas desenvolvidas com PLGA 503.

	Sol. metanólica NaOH 0,1 N QC2			Sol. metanólica NaOH 0,1 N QC10		
	Conc. (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)	Conc. (µg/mL)	Média (µg/mL)	DPR (%)
1	20,38	20,64	0,78	19,53	19,59	0,30
2	20,78			19,64		
3	20,51			19,54		
4	20,76			19,53		
5	20,69			19,64		
6	20,72			19,65		

## Exatidão

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor considerado verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras às quais são adicionadas quantidades da substância de referência, sendo expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O método é considerado exato quando todos os valores experimentais de recuperação encontrem-se entre 95 e 105 %.

Os resultados da análise da exatidão e as concentrações determinadas experimentalmente (16, 20 e 24 µg/mL) estão demonstrados nas tabelas 14 e 15. A recuperação ficou dentro dos limites preconizados demonstrando que os métodos desenvolvidos são exatos.

Tabela 14. Dados de exatidão para avaliação das micropartículas desenvolvidas com Eudragit® RS100.

Eudragit® RS100	Conc. teórica (µg/mL)	Conc. Experimental (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
QC2	16	15,58	97,39	0,33
	20	19,50	97,53	1,66
	24	23,61	98,37	1,66
QC10	16	15,76	98,50	0,84
	20	19,75	98,75	0,77
	24	24,38	101,57	2,50

Tabela 15. Dados de exatidão para avaliação das micropartículas desenvolvidas com PLGA 503.

PLGA 503	Conc. teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
QC2	16	16,11	100,69	0,65
	20	20,52	102,62	0,38
	24	24,76	103,15	0,18
QC10	16	15,68	96,68	1,51
	20	19,44	97,19	1,11
	24	23,63	98,06	0,36

### Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade do método para a quantificação das chalconas QC2 e QC10 foi avaliada pela determinação dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do analito que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada como um valor exato (ICH, 2005). O limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor quantidade de analito em uma amostra capaz de ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (ICH, 2005).

A determinação do limite de detecção e limite de quantificação foi calculada com base no desvio padrão do intercepto, com o eixo y e a inclinação da reta de calibração (tabela 16).

Tabela 16. Limite de detecção e quantificação obtidas para validação da metodologia por CLAE para as chalconas.

	QC2		QC10	
	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Metanol	0,218	0,661	0,383	1,162
Sol. Metanólica de NaOH 0,1 N	0,151	0,456	0,087	0,265

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação.

Os resultados obtidos na detecção e quantificação das chalconas QC2 e QC10 por cromatografia líquida de alta eficiência mostram que os métodos desenvolvidos são específicos, sensíveis, precisos e lineares na faixa de concentração testada. Estes métodos validados foram

utilizados para determinar a eficiência de encapsulação e teor das chalconas nas micropartículas poliméricas.

### **3.1.2 Avaliação físico-química das micropartículas**

#### **Avaliação morfológica e determinação de tamanho de partícula**

A análise morfológica das partículas, realizada por meio de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelou partículas esféricas independentemente do tipo de polímero utilizado (figura 15). Da mesma forma, foi possível observar que os sistemas apresentam uma pequena dispersão de tamanho e que as micropartículas preparadas com o polímero PLGA são maiores, quando comparadas às micropartículas de Eudragit<sup>®</sup> RS100. As MCP brancas de Eudragit e PLGA (figura 15a e 15b, respectivamente) exibem formato esférico e superfície lisa.

As MCP de Eudragit contendo a chalcona QC2 (figura 15c) apresentam formato esférico, superfície lisa e diâmetro médio em volume de 94  $\mu\text{m}$  e faixa granulométrica variando de 57 a 139  $\mu\text{m}$  (tabela 17). Para as MCP de Eudragit contendo QC10 (figura 15e) foi possível visualizar micropartículas irregulares com superfície rugosa e apresentando resíduos de polímero. Quanto ao tamanho, esse sistema apresenta um diâmetro médio em volume de 106  $\mu\text{m}$  e faixa granulométrica variando de 59 a 164  $\mu\text{m}$ .



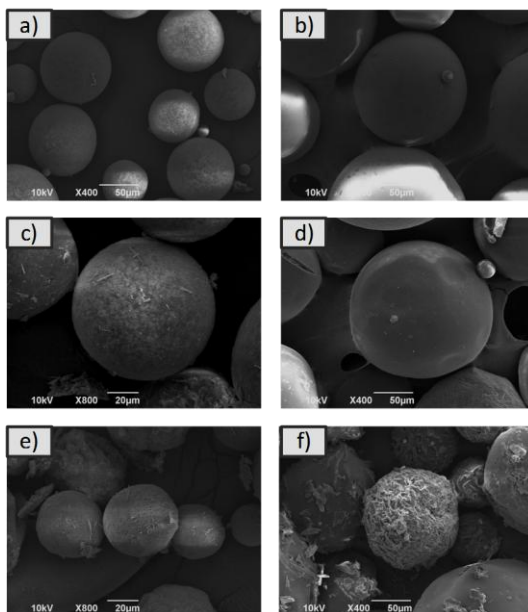


Figura 15. Micrografias obtidas por MEV (a) MCP brancas de Eudragit, (b) MCP brancas de PLGA, (c) Eudragit/QC2, (d) PLGA/QC2, (e) Eudragit/QC10 e (f) PLGA/QC10.

As micropartículas de PLGA/QC2 (figura 15d) apresentam morfologia esférica e superfície lisa e diâmetro médio em volume de 178  $\mu\text{m}$  e faixa granulométrica variando de 119 a 245  $\mu\text{m}$ . Já as micropartículas de PLGA/QC10 (figura 15f) apresentam-se esféricas com a superfície rugosa. Para esse sistema alguns cristais de fármaco foram observados na superfície das micropartículas, o que pode estar relacionado à concentração de QC10 para essa formulação. Essa quantidade de chalcona, aderida à parte externa da MCP, pode ser rapidamente dissolvida no meio aquoso promovendo uma liberação imediata da mesma (STULZER, 2008; RIEKES et al., 2011). Quanto ao tamanho, a formulação PLGA/QC10 foi caracterizada por um diâmetro médio em volume de 198  $\mu\text{m}$  e faixa granulométrica variando de 111 a 272  $\mu\text{m}$ .

Uma vez que as condições de preparação foram mantidas para todos os sistemas desenvolvidos e que o tipo de chalcona não

influenciou no tamanho de partículas preparadas com o mesmo polímero (tabela 17), as variações de tamanho podem ser atribuídas exclusivamente ao tipo de polímero. Conforme descrito na literatura, a utilização de diferentes polímeros na produção de micropartículas sob idênticas condições de preparação pode levar à obtenção de partículas com diferentes tamanhos, fato este relacionado à diferença de peso molecular e/ou da viscosidade dos mesmos na fase orgânica (O'DONNELL; MCGINITY, 1997; HESLINGA; MASTRIA; ENIOLA-ADEFESO, 2009; BUSKE et al., 2012).

Como pode ser observado na tabela 17, as MCP desenvolvidas com PLGA são maiores do que aquelas preparadas com Eudragit® RS100. Este resultado pode ser atribuído à viscosidade intrínseca (v.i.) destes polímeros na fase orgânica, constituída pelo diclorometano. O PLGA apresenta uma v.i. de  $0,4 \text{ dL.g}^{-1}$  (CHEN, 2004) enquanto o Eudragit® RS100 apresenta uma v.i.  $0,2 \text{ dL.g}^{-1}$  (CILURZO et al., 2000). Uma solução mais viscosa exige maior força de cisalhamento para a emulsificação, o que leva a formação de gotas maiores, resultando, consequentemente, em partículas de maior diâmetro (KENDALL et al., 2009).

Tabela 17. Granulometria das micropartículas d(4,3): diâmetro médio em volume; d(0,1  $\mu\text{m}$ ), d(0,5  $\mu\text{m}$ ) e d(0,9  $\mu\text{m}$ ) diâmetro de partícula correspondente, respectivamente, a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada; span: polidispersão de tamanhos.

Amostras	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )				SPAN
	d <sub>4,3</sub>	d <sub>10%</sub>	d <sub>50%</sub>	d <sub>90%</sub>	
PLGA QC2	178	119	171	245	0,737
PLGA QC10	198	111	172	272	0,937
Eudragit QC2	94	57	90	139	0,909
Eudragit QC10	106	59	100	164	1,050

Quanto à distribuição de tamanhos, representada pelo valor de span, todos os sistemas obtidos apresentaram baixos valores (valor máximo de cerca de 1,0), indicando uma baixa polidispersão.

## **Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)**

A aplicação de técnicas termoanalíticas como CED e TGA na caracterização de materiais fornecem resultados de pureza, fusão e compatibilidade entre os componentes da formulação.

A curva termogravimétrica (TG) demonstrou que a molécula de QC2 apresenta um único evento de perda de massa na faixa de temperatura compreendida entre 305 e 350 °C ( $\Delta m = 94,83 \%$ ) (figura 16a). Para a curva de CED foi possível visualizar um único ponto de fusão para QC2 em 159,06 °C, ( $\Delta H_{\text{fusão}} = -116,94 \text{ J/g}$ ).

No caso da chalcona QC10 a curva de TG mostrou que a QC10 apresenta três etapas de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura: de 22 a 85 °C ( $\Delta m = 6,39 \%$ ), de 215 a 282 °C ( $\Delta m = 13,66 \%$ ) e de 282 a 380 °C ( $\Delta m = 32,99 \%$ ), totalizando uma perda de massa de 63 % (figura 16b). Este resultado indica que, na faixa de temperatura analisada, a chalcona QC10 não apresentou completa perda de massa, sugerindo uma maior estabilidade térmica deste composto quando comparado à chalcona QC2. Ao avaliar a curva de CED para a chalcona QC10 foi possível visualizar dois eventos de fusão, o primeiro evento em 110,7 °C, ( $\Delta H_{\text{fusão}} = -13,37 \text{ J/g}$ ) e o segundo em 166,3 °C, ( $\Delta H_{\text{fusão}} = -68,25 \text{ J/g}$ ).

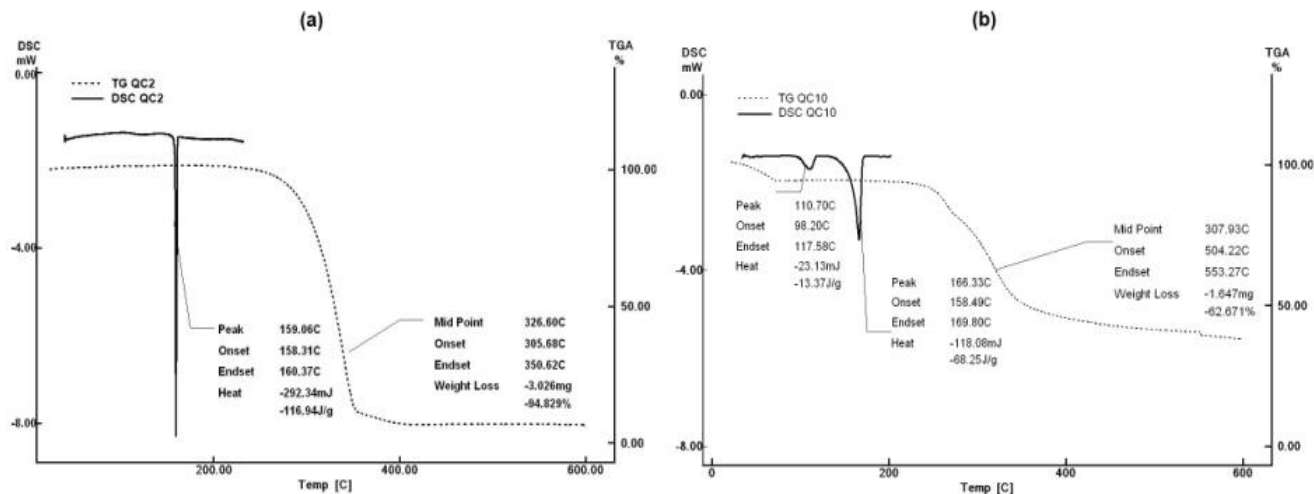


Figura 16. Curvas TG/ CED das chalconas QC2 (a) e QC10 (b), obtidas sob a razão de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ).

As curvas de TG obtidas para os sistemas microparticulados contendo a chalcona QC2 são apresentadas na figura 17a. O sistema Eudragit/QC2 apresenta um único evento de perda de massa na faixa de temperatura compreendida entre 320 e 450 °C ( $\Delta m = 100,63\%$ ). Uma vez que a degradação térmica desta formulação inicia-se em uma temperatura superior à encontrada para a chalcona pura, conclui-se que esse sistema confere maior estabilidade térmica à chalcona QC2. Por outro lado, ao avaliar o sistema PLGA QC2 foi possível visualizar um único evento de perda de massa entre 220 e 430 °C ( $\Delta m = 99,32\%$ ), semelhante ao obtido para a chalcona QC2 isoladamente. Dessa forma, sugere-se que não houve alteração significativa da estabilidade térmica da chalcona QC2 quando comparado ao sistema microparticulado.

A figura 17b apresenta os resultados obtidos para os sistemas poliméricos contendo a chalcona QC10. Ambos sistemas apresentam um único evento de degradação; para o sistema PLGA/QC10 o evento de perda de massa ocorre entre 250 e 410 °C ( $\Delta m = 98,16\%$ ), enquanto que para o sistema Eudragit/QC10 o evento de perda de massa foi observado entre 320 e 430 °C ( $\Delta m = 98,92\%$ ). Como se pode observar, os dois sistemas apresentaram o início da sua degradação térmica em temperaturas superiores à temperatura inicial de degradação da chalcona QC10, indicando que estes sistemas conferiram maior estabilidade térmica ao composto.

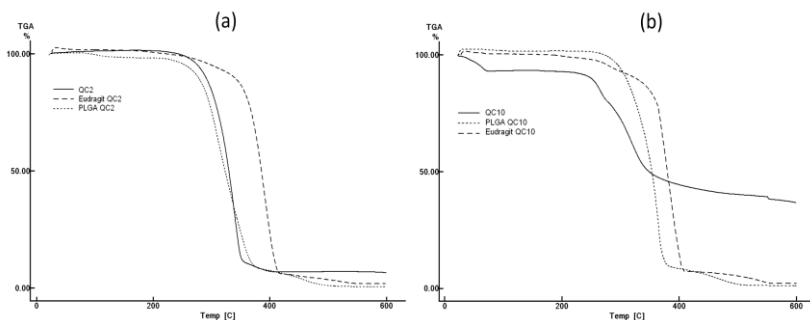


Figura 17. Curvas de TG dos sistemas microparticulados contendo os polímeros Eudragit®RS100 e PLGA 503 obtidos a partir das chalconas QC2 (a) e QC10 (b), sob a razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>).

A utilização do CED, por ser um método rápido de análise, tem sido proposta para avaliar interações físico-químicas entre os componentes da formulação através da comparação entre as curvas térmicas obtidas a partir da mistura física e, desta forma, selecionar adequadamente os componentes para uma formulação (VERMA; GARG, 2004; BERNARDI et al., 2009).

A figura 18 (a e b) apresenta as curvas de CED das chalconas, dos polímeros, das misturas físicas na proporção 1:10 (chalcona:polímero m/m, obtidas por simples homogeneização dos componentes em vórtex por 1 minuto) e dos sistemas microparticulados Eudragit/QC2, Eudragit/QC10, PLGA/QC2 e PLGA/QC10.

Nenhum dos polímeros apresentou eventos de fusão na faixa de temperatura analisada. Para as misturas físicas PLGA-QC2 e Eudragit-QC2 observou-se um leve deslocamento para temperaturas inferiores do ponto de fusão da chalcona, o que pode indicar uma interação física desta com os respectivos polímeros. No entanto, um comportamento oposto foi observado para as misturas físicas contendo a chalcona QC10. Neste caso, houve um deslocamento do ponto de fusão para temperaturas superiores, mas este resultado também pode indicar uma interação física entre os componentes em questão. Para as curvas relativas aos sistemas microparticulados, apenas a formulação Eudragit/QC2 apresentou evento de fusão relativo à chalcona, porém também deslocado. Quanto aos outros sistemas, pode-se inferir a ocorrência de uma provável amorfização durante a obtenção das micropartículas, a qual poderá ser melhor avaliada pela técnica de difração de raios-X de pó.

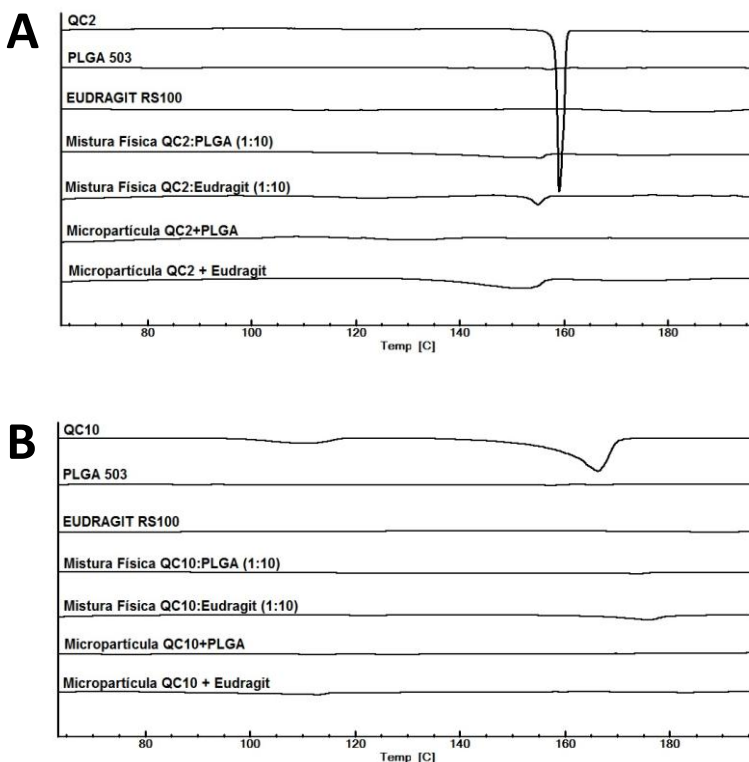


Figura 18. Curvas de CED referentes à (A) chalcona QC2, suas misturas físicas e sistemas microparticulados e (B) chalcona QC10, suas misturas físicas e sistemas microparticulados sob a razão de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ).

## Difração de Raios-X de pó

Substâncias no estado sólido podem apresentar características cristalinas ou amorfas e, em alguns casos, ambas. Um cristal tem um arranjo ordenado de moléculas e átomos, que são mantidos em contato por meio de interações não covalentes. Por outro lado, os sólidos no estado amorfo são formados por arranjos atômicos aleatórios sem simetria ou ordenação de longo alcance.

A técnica de difração de raios-X de pó permitiu avaliar as características de cristalinidades para as matérias-primas, misturas físicas e sistemas microparticulados, possibilitando uma maior compreensão de compatibilidade entre as matérias-primas e padrão de cristalinidade das amostras dos sistemas microparticulados.

Para avaliação da cristalinidade das chalconas, polímeros, misturas físicas na proporção 1:10 (chalcona:polímero m/m, obtidas por simples homogeneização dos componentes em vórtex por 1 minuto) e dos sistemas microparticulados Eudragit/QC2, Eudragit/QC10, PLGA/QC2 e PLGA/QC10, obtiveram-se os difratogramas apresentados na Figura 19.

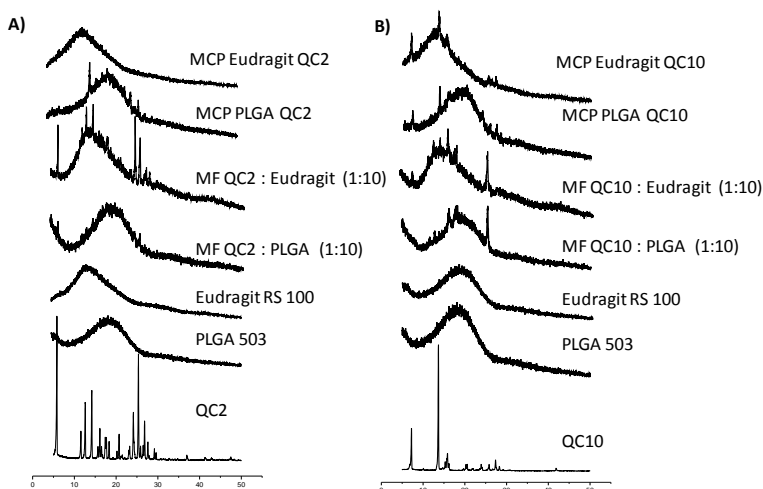


Figura 19. Difratogramas referentes à (A) chalcona QC2, suas misturas físicas e sistemas microparticulados e (B) chalcona QC10, suas misturas físicas e sistemas microparticulados.

A chalcona QC2 (figura 19 A) apresenta características cristalinas com suas reflexões mais evidentes em  $2\theta$ :  $5,82^\circ$ ,  $12,67^\circ$ ,  $14,19^\circ$ ,  $24,07^\circ$ ,  $25,69^\circ$  e  $26,91^\circ$ . Por outro lado, os polímeros apresentam características amorfas, visto que nenhuma reflexão foi observada. Para as misturas



físicas dos sistemas QC2-PLGA e QC2-Eudragit foram observados reflexões referentes à chalcona QC2 sobrepostas aos halos amorfos dos polímeros. Um perfil semelhante foi também encontrado para a micropartícula PLGA/QC2, sendo esta caracterizada como semicristalina. No entanto, o sistema microparticulado Eudragit/QC2 revelou-se amorfo, com ausência de quaisquer reflexões, sugerindo uma reorganização da chalcona QC2 para o estado amorfo quando da obtenção da micropartícula.

A molécula QC10 (figura 19 B) também apresentou características cristalinas e as suas reflexões mais evidentes em  $2\theta$ :  $7.19^\circ$ ,  $13.68^\circ$ ,  $15.67^\circ$  e  $27.49^\circ$  foram tomadas como referência para avaliar o comportamento cristalino da mistura física e dos sistemas microparticulados. Para as misturas físicas QC10-PLGA e QC10-Eudragit foram observadas reflexões referentes à chalcona QC10 sobrepostas aos halos amorfos dos polímeros. As micropartículas Eudragit/QC10 e PLGA/QC10 foram caracterizadas como semicristalinas, pois embora exibam reflexões referentes à chalcona QC10, observam-se também halos de amorfização.

Com exceção das micropartículas Eudragit/QC2, as quais se encontram no estado amorfo, uma notável redução da intensidade das reflexões para os demais sistemas microparticulados foi observada. Este fenômeno sugere uma dissolução das substâncias ativas nos polímeros avaliados conforme dados previamente descritos em literatura (FERNÁNDEZ-CARBALLIDO et al., 2004; ADIBKIA et al., 2007; KLOSE et al., 2009; JAVADZADEH et al., 2010).

Embora não tenham sido evidenciados eventos de fusão por CED para as micropartículas PLGA/QC2, Eudragit/QC10 e PLGA/QC10, a amorfização proposta não foi confirmada por DRX. Por outro lado, para as micropartículas Eudragit/QC2, embora havendo apresentado um evento de fusão indicativo de cristalinidade quando da avaliação por CED, esta hipótese não foi confirmada por DRX. Desta forma, a complementação de técnicas para avaliação de características de estado sólido torna-se extremamente necessária, uma vez que a utilização de uma técnica isolada pode levar a conclusões equivocadas.

Considerações sobre o estado amorfo e cristalino são importantes em relação ao processo de absorção. As transformações que levam à amorfização são um dos principais motivos que levam ao aumento da solubilidade aparente, melhorando o contato entre o fármaco e o meio de dissolução (STULZER, 2008; JANSSENS et al., 2008; RIEKES et al., 2011). Em um sólido amorfo as moléculas estão arrançadas ao acaso,

portanto, baixa energia é requerida para separá-las, consequentemente a dissolução é mais rápida. Neste sentido, o desenvolvimento de novos sistemas para veicular uma substância ativa no estado amorfo frequentemente é benéfico em termos de melhoria de dissolução e biodisponibilidade (CORRIGAN, 1995).

### 3.1.3 Determinação da eficiência de encapsulação, teor de chalconas e Rendimento

A eficiência de encapsulação traduz a quantidade de chalcona encapsulada nas micropartículas e foi determinada conforme descrito no item 2.2.4 por CLAE desenvolvida e validada para esta finalidade. O teor de chalcona nas micropartículas indica a quantidade de chalcona presente em 100 mg de micropartículas.

A tabela 18 apresenta os valores de eficiência de encapsulação e teor das chalconas QC2 e QC10 para as micropartículas poliméricas desenvolvidas com PLGA 503 e Eudragit® RS100. Considerando os resultados, pode-se dizer que ambos os sistemas foram capazes de encapsular as chalconas com alta eficiência. Todas as formulações apresentam rendimento superior a 90%, indicando poucas perdas durante o preparo das micropartículas.

Tabela 18. Dados de EE% e teor de chalcona obtidos para micropartículas poliméricas.

Amostra	EE%	Teor (mg/100mg)	Rendimento (%)
PLGA/QC2	96,91 ± 1,94	9,60 ± 1,96	93,49 ± 4,95
PLGA/QC10	82,77 ± 1,46	7,47 ± 1,46	90,13 ± 2,67
Eudragit/QC2	98,75 ± 1,25	8,91 ± 1,38	91,13 ± 2,85
Eudragit/QC10	99,48 ± 0,90	9,05 ± 0,90	93,61 ± 1,28

As micropartículas preparadas com PLGA apresentaram a maior EE e teor quando a chalcona QC2 foi encapsulada. O menor valor de EE no sistema PLGA/QC10 pode estar relacionado à maior solubilidade desta molécula em meio aquoso, comparado à QC2, favorecendo a difusão e partição para a fase aquosa (YANG et al., 2009). Estudos

anteriores empregando a técnica de emulsão/evaporação relatam que a encapsulação do ativo pode ser influenciada pela velocidade de solidificação do polímero durante o preparo das micropartículas, etapa na qual a difusão do ativo é facilitada, e pela afinidade do ativo pela fase aquosa (YEO; PARK, 2004; JELVEHGARI et al., 2011).

Para os sistemas microparticulados preparados com Eudragit® RS100 foi observada uma eficiência de encapsulação muito próxima a 100 %. Este resultado pode ser atribuído às características do polímero, cuja estrutura apresenta uma baixa concentração de grupos quaternários de amônio (em torno de 5 %) (BEHERA et al., 2008). Estes grupamentos, quando em grandes proporções, tornam o polímero Eudragit mais permeável, o que pode facilitar a difusão do fármaco para o meio externo durante a formação das micropartículas, promovendo uma redução nos valores de EE (JELVEHGARI et al., 2011).

### **3.1.4 Avaliação do perfil de liberação dos sistemas microparticulados**

#### **Avaliação da solubilidade das chalconas QC2 e QC10 no meio de dissolução**

O meio de dissolução deve ser determinado considerando a solubilidade e a faixa de dosagem do analito, de maneira a assegurar que as condições *sink* sejam mantidas. Condições *sink* são obtidas quando a quantidade do solvente corresponde a dez vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do analito testado. Esta condição deve ser mantida para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (AULTON, ORTEGA, 2008). No entanto, para moléculas hidrofóbicas, como é o caso das chalconas QC2 e QC10, uma menor relação soluto:solvente é admitida, e estudos são conduzidos na literatura com uma quantidade de solvente de no mínimo três vezes o volume de saturação (MARQUES, BROWN, 2002).

O uso de tensoativos, como por exemplo, lauril sulfato de sódio em meios de dissolução é uma das principais formas de aumentar a solubilidade de fármacos insolúveis ou pouco solúveis em meios aquosos (AMIDON et al., 1995; DA SILVA, VOLPATO, 2002), sendo apropriado em estudos de liberação devido à possibilidade de simular o

ambiente *in vivo* do lúmen intestinal (GALIA et al., 1998). Assim, o meio selecionado para a avaliação do perfil de liberação a partir dos sistemas microparticulados foi o tampão fosfato de sódio (100 mM) pH 7,4 acrescido de 0,5 % de lauril sulfato de sódio. A solubilidade das chalconas QC2 e QC10 neste meio, determinada experimentalmente, foi de  $114,02 \pm 0,90$  e  $243,05 \pm 1,53$  µg/mL, respectivamente.

### **Preparação das curvas analíticas das chalconas QC2 e QC10 no meio de dissolução**

Para a determinação da concentração das chalconas no meio de dissolução, curvas de calibração foram construídas no intervalo de 2-40 µg/mL. A tabela 19 apresenta a faixa de concentração de cada um dos analitos, as equações de retas utilizadas na conversão entre as áreas do pico e o coeficiente de correlação. Valores de coeficiente iguais ou superiores a 0,99 indicam uma correlação aceitável na conversão da área do pico em concentração do analito (BRASIL, 2003). Desta forma as curvas analíticas para QC2 e QC10 apresentaram excelente coeficiente de correlação (r), sendo, portanto linear nos respectivos intervalos.

Tabela 19. Dados de linearidade para as chalconas QC2 e QC10 obtidos em solução Tampão fosfato (0,1 M) pH 7,4 acrescido de 0,5 % lauril sulfato de sódio.

Composto	Intervalo (µg/mL)	Equação da reta	r
QC2	2 - 40	$y = 59115x \pm 6812,7$	0,9994
QC10	2 - 40	$y = 88310x \pm 14194$	0,999

r: Coeficiente de correlação.

### **Avaliação do perfil de liberação *in vitro* dos sistemas microparticulados**

A figura 21 apresenta os perfis de liberação dos sistemas microparticulados Eudragit/QC2, Eudragit/QC10, PLGA/QC2 e PLGA/QC10 obtidos em 24 horas. Devido à solubilidade limitada das chalconas, não foi possível manter condições *sink* durante este estudo. No entanto a avaliação do perfil de liberação foi conduzida sempre mantendo um volume de meio pelo menos três vezes superior à solubilidade das chalconas, garantindo que a solubilidade não constituísse um fator limitante de liberação das mesmas.

Entre os fatores que influenciam a cinética de liberação das chalconas destacam-se o tipo de polímero, assim como o tamanho e a distribuição granulométrica das micropartículas desenvolvidas a partir dos mesmos (FREIBERG, ZHU, 2004). Estudos recentes revelam, porém, que o tipo de fármaco também desempenha um papel importante na determinação da velocidade de liberação (FRANK; RATH; VENKATRAMAN, 2005; SIEGEL et al., 2006; MAKADIA; SIEGEL, 2011). Fármacos no estado amorfo conferem propriedades vantajosas de dissolução podendo melhorar a liberação a partir do sistema microparticulado e absorção *in vivo* (PASSERINI et al., 2006; KENDALL et al., 2009).

Nos resultados apresentados dos perfis de liberação pode-se observar que o sistema PLGA/QC2 não apresentou liberação durante o período avaliado, o que provavelmente esteja correlacionado à solubilidade de QC2 no meio de liberação. Resultado semelhante foi obtido por Liu e colaboradores (2007), na avaliação do perfil de liberação de paclitaxel a partir de micropartículas poliméricas de PLGA, preparadas pela técnica emulsão/evaporação do solvente. O paclitaxel é um fármaco que apresenta baixa solubilidade em meio aquoso. Os autores observaram uma baixa taxa de liberação em 24 horas, de aproximadamente 3 %, semelhante ao resultado obtido pelo sistema PLGA/QC2 durante o mesmo período.

Para o sistema PLGA/QC10 houve uma rápida liberação na primeira hora de análise, que correspondeu a aproximadamente 40 %, seguido por um maior controle de liberação ao longo do tempo. Como pode ser observado na figura 20b, as micropartículas de PLGA/QC10 após a dissolução apresentam-se rugosas e com rachaduras, porém não foi possível visualizar a presença de cristais da chalcona sobre a superfície das micropartículas. Este resultado sugere que a rápida liberação inicial promovida por este sistema esteja relacionada aos cristais de QC10 que se encontravam adsorvidos à superfície das micropartículas de PLGA/QC10 (figura 15f). O padrão de liberação observado para o sistema PLGA/QC10 pode ser dividido em duas fases: inicialmente, uma rápida liberação da chalcona adsorvida à matriz e uma segunda fase, mais lenta, que provavelmente esteja relacionada ao fenômeno de difusão a partir da matriz polimérica (O'DONNELL; MCGINITY, 1997; FREIBERG; ZHU, 2004a).

Ao comparar os perfis de liberação a partir dos sistemas Eudragit/QC2 e Eudragit/QC10 foi possível observar diferenças significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre todos os tempos avaliados. Com o

sistema Eudragit/QC10 ocorre uma rápida liberação inicial, atingindo o máximo da liberação em quatro horas, não havendo diferença estatística entre os demais tempos de estudo. No entanto, o sistema Eudragit/QC2 demonstrou um maior controle da liberação, liberando aproximadamente 80 % em 12 horas. O resultado obtido por DRX sugere que a chalcona QC2 presente nas micropartículas de Eudragit encontra-se majoritariamente no estado amorfo, contribuindo desta forma com a liberação a partir deste sistema. Um dos possíveis mecanismos envolvidos na melhora da taxa de dissolução para a chalcona QC2 pode estar relacionada à transformação do estado cristalino da chalcona para o estado amorfo.

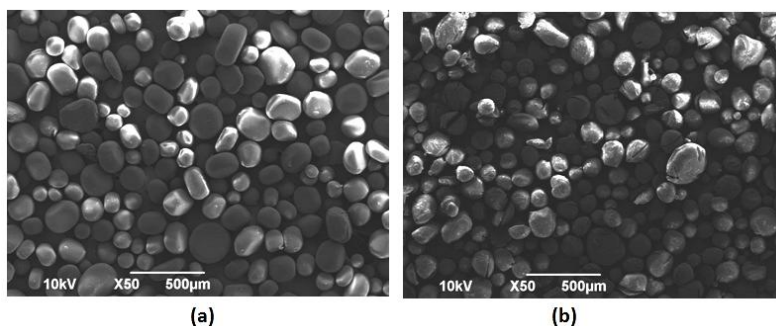


Figura 20. Micrografias obtidas por MEV das micropartículas de PLGA QC2 (a) e PLGA QC10 (b), após ensaio de dissolução.

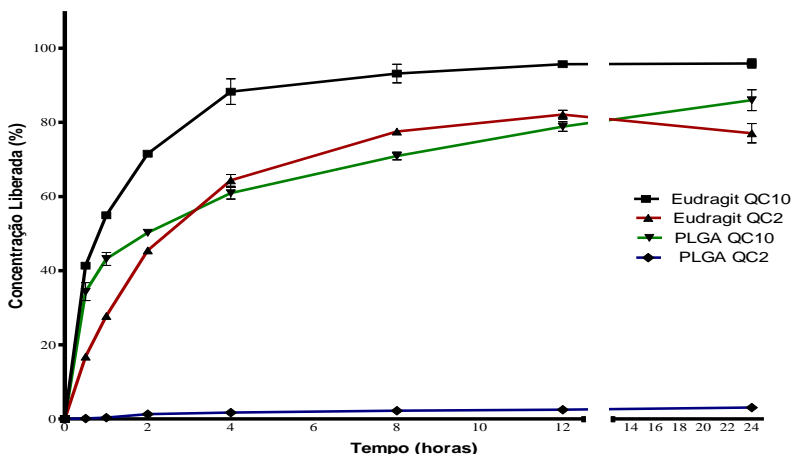


Figura 21. Perfis de liberação dos sistemas microparticulados Eudragit/QC2, Eudragit/QC10, PLGA/QC2 e PLGA/QC10 em tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 0,5 % de lauril sulfato de sódio, mantidos na temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C, com agitação magnética constante de 150 rpm.

### 3.1.5 Estudo *in vivo*

As chalconas são uma importante classe de compostos naturais que apresentam uma ampla aplicação na química orgânica como moléculas precursoras para síntese de novos compostos. Aos compostos sintetizados a partir do núcleo base das chalconas são reportadas diversas e interessantes atividades biológicas (ALBERTON et al., 2008; DE CARVALHO TAVARES et al., 2011).

As chalconas são conhecidas por exibirem efeito no metabolismo de carboidratos, especialmente no metabolismo da glicose. O potencial antidiabético das chalconas foi investigada em relação à atividade de dissacaridasas intestinais, na curva de tolerância à glicose e na secreção de insulina sérica (SEO et al., 2005; DAMAZIO et al., 2009; DAMAZIO et al., 2010).

Estudos realizados pela equipe da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Regina Mena Barreto Silva no laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais da UFSC, avaliaram o efeito de diversos grupos funcionais das chalconas, derivados da série 6-quinolil, demonstrando um promissor efeito anti-

hiperglicêmico destas moléculas. Entre as chalconas avaliadas destacam-se os análogos QC2 e QC10, cuja estrutura química pode ser visualizada na figura 13 (PEREIRA, 2011).

Estudos realizados por Alberton e colaboradores (2008) indicaram que a inclusão de substituintes doadores (grupamentos metóxi) e aceptores de elétrons (grupamento nitro) incrementam a atividade anti-hiperglicêmica das chalconas. A atividade anti-hiperglicêmica para os compostos QC2 e QC10, que apresentam como substituinte o radical metil, que atua como fraco doador de elétrons foi demonstrada por Pereira e colaboradores (2011). O análogo QC2 reduziu o nível sérico da glicose em 29 % quando administrado na dose de 20 mg/Kg. Para o análogo QC10 a redução foi de 30 % quando administrado nas doses de 10 e 20 mg/Kg em relação ao controle hiperglicêmico no teste da curva de tolerância à glicose aos 30 minutos.

Além da atividade anti-hiperglicemiante, o análogo QC10 apresentou atividade secretagoga de insulina. Estudos em ratos hiperglicêmicos tratados com o análogo QC10 demonstraram que o composto aumenta a secreção de insulina em 164 % em relação ao controle hiperglicêmico (ratos que receberam apenas glicose) no tempo de 60 min. De acordo com esses resultados o análogo QC10 parece influenciar na segunda fase de secreção de insulina (PEREIRA, 2011).

Levando em conta a promissora atividade antidiabética destes compostos e as vantagens dos sistemas de liberação prolongada, o comportamento dos sistemas microparticulados contendo as chalconas QC2 ou QC10 foi avaliado no teste da curva de tolerância à glicose em modelo hiperglicêmico *in vivo*. O efeito de prolongamento da ação metabólica promovida pelos sistemas microparticulados foi avaliado em comparação aos efeitos promovidos pelas chalconas administradas isoladamente.

Com objetivo de avaliar o perfil de liberação *in vivo* das chalconas a partir dos sistemas microparticulados, foi utilizada a técnica de curva de tolerância à glicose (ALBERTON et al., 2008). Este estudo se baseia na administração (via oral) concomitante de uma dose de glicose e do fármaco a ser analisado e coletas de sangue são feitas em tempos pré-estabelecidos por um período de 3 horas. Por se tratar de um sistema de liberação prolongada, o teste foi adaptado com intuito de avaliar se o sistema continuaria reduzindo os níveis de glicose por um período de tempo maior (6 horas). Desta forma, após 3 horas da administração inicial de glicose, uma nova dose (carga) foi administrada



nos ratos e as coletas das amostras seguiram nos tempos de 180, 210 e 360 min.

Os testes foram realizados em três diferentes grupos: euglicêmico, controle hiperglicêmico e hiperglicêmico tratado. Todos os animais foram mantidos privados de alimentos por 16 horas, sendo a eles apenas disponibilizado água. Os animais hiperglicêmicos (controles e tratados) receberam duas doses de glicose (4 g/kg; 8,9M), imediatamente após a coleta dos pontos 0 e 180 min. Para os animais hiperglicêmicos tratados foi administrado um pré-tratamento 30 min antes da primeira coleta, com as chalconas (QC2 e QC10) puras ou sistemas microparticulados: PLGA/QC2, PLGA/QC10, Eudragit/QC2 ou Eudragit/QC10.

A coleta no tempo zero de cada grupo, antes da sobrecarga inicial de glicose, foi considerada como o valor de referência dos níveis séricos de glicose basal. As coletas intermediárias de 30 e 210 min avaliaram o aumento da glicemia trinta minutos após as respectivas doses de glicose (4 g/kg; 8,9M). Já as coletas em 180 e 360 min foram utilizadas como controles, verificando o retorno da glicemia aos níveis séricos basais.

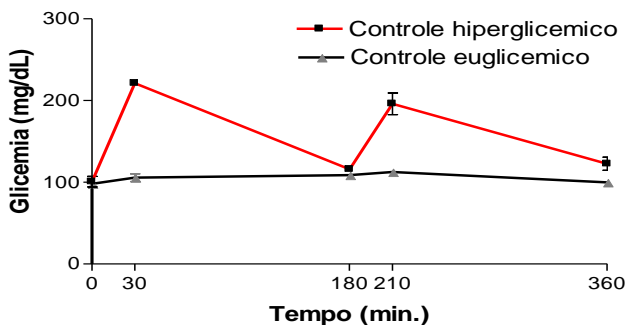


Figura 22. Perfil para o controle hiperglicêmico após as duas cargas de glicose e controle euglicêmico avaliados em ratos machos Wistar.

Como resultado, podemos observar na figura 22 que o grupo controle hiperglicêmico atingiu o pico da glicemia (221 mg/dL) em 30 min depois da primeira dose de glicose, com o retorno da glicemia aos níveis séricos basais em 180 min. Um novo pico da glicemia foi alcançado após a sobrecarga de glicose, em 210 min (196 mg/dL)

retornando aos níveis basais em 360 min. Estes resultados demonstram que adaptação proposta à metodologia é adequada para avaliar a glicemia em ratos após a administração de duas doses de glicose. Para os ratos euglicêmicos foram observadas pequenas flutuações nos níveis séricos de glicose, que podem estar associadas ao estresse dos animais durante o experimento.

Após avaliar o resultado obtido para o grupo controle hiperglicêmico iniciaram-se os experimentos com os grupos hiperglicêmicos tratados. Os animais foram divididos em seis grupos de cinco animais, conforme especificado na tabela 20, na qual podem ser visualizados os resultados obtidos para todos os grupos avaliados. Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos, cada grupo foi avaliado e discutido separadamente.

Tabela 20. Efeito das chalconas QC2 e QC10 nas doses de 5 ou 15 mg/kg em relação aos sistemas microparticulados de Eudragit e PLGA na curva de tolerância à glicose nas respectivas doses.

Grupo	Tratamento	Dose	Tempo (min)				
			0	30	180	210	360
I	Euglicêmico	Veículo	98,2 ± 4,1	105,6 ± 6,3	108,7 ± 3,8	112,5 ± 1,8	99,9 ± 2,4
II	Cont.	Glicose	100,6 ± 6,5	221,3 ± 4,0	115,9 ± 3,4	196,1 ± 13,2	122,6 ± 7,9
	Hiperglicêmico						
Hiperglicêmicos tratados							
III	QC2	5 (mg/kg)	102,6 ± 1,3	138,6 ± 4,3	125,7 ± 2,3	159,7 ± 2,8	126,5 ± 1,8
a)	Eudragit QC2	5 (mg/kg)	95,2 ± 2,9	163,3 ± 10,8 <sup>***</sup>	138,3 ± 6,0	191,7 ± 3,0 <sup>***</sup>	151,5 ± 3,5 <sup>***</sup>
b)	PLGA QC2	5 (mg/kg)	103,3 ± 10,9	165,9 ± 1,7 <sup>***</sup>	125,8 ± 2,4	148,9 ± 1,9	133,9 ± 1,9
IV	QC2	15 (mg/kg)	96,4 ± 2,2	130,8 ± 7,2	113,4 ± 0,9	154,7 ± 1,2	126,6 ± 0,7
a)	Eudragit QC2	15 (mg/kg)	101,8 ± 3,3	119,8 ± 2,4 <sup>**</sup>	122,7 ± 0,7 <sup>*</sup>	138,9 ± 4,9 <sup>***</sup>	131,8 ± 0,9
b)	PLGA QC2	15 (mg/kg)	99,5 ± 3,5	148,9 ± 7,0 <sup>***</sup>	124,9 ± 4,1 <sup>*</sup>	144,9 ± 1,8	133,6 ± 1,7
V	QC10	5 (mg/kg)	100,1 ± 4,2	158,0 ± 6,1	123,0 ± 0,6	152,9 ± 0,6	137,6 ± 2,6
a)	Eudragit QC10	5 (mg/kg)	96,4 ± 0,5	140,7 ± 0,3 <sup>***</sup>	118,8 ± 1,3	143,4 ± 4,0 <sup>*</sup>	120,6 ± 2,7 <sup>***</sup>
b)	PLGA QC10	5 (mg/kg)	100,7 ± 1,7	145,4 ± 3,4 <sup>**</sup>	125,3 ± 1,3	165,8 ± 2,1 <sup>**</sup>	121,3 ± 3,1 <sup>***</sup>
VI	QC10	15 (mg/kg)	105,8 ± 4,6	126,4 ± 1,9	128,5 ± 1,6	165,9 ± 3,8	136,6 ± 3,1
a)	Eudragit QC10	15 (mg/kg)	96,1 ± 1,2	131,7 ± 1,4	115,6 ± 2,1 <sup>*</sup>	134,8 ± 1,3 <sup>***</sup>	112,0 ± 1,5 <sup>***</sup>
b)	PLGA QC10	15 (mg/kg)	101,1 ± 2,6	133,8 ± 2,6	125,4 ± 2,0	157,7 ± 3,7	124,4 ± 6,0

Os valores foram expressos como a média ± DP. ; n=5. Avaliando a significância <sup>\*</sup>  $p \leq 0,05$ , <sup>\*\*</sup>  $p \leq 0,01$  e <sup>\*\*\*</sup>  $p \leq 0,001$ ; entre as doses das chalconas QC2 e QC10 em relação aos sistemas microparticulados de cada grupo.

A figura 23 apresenta os resultados obtidos para o análogo QC2 puro na curva de tolerância à glicose em relação ao controle hiperglicêmico. Como se pode observar, não houve diferenças significativas entre as doses de 5 e 15 mg/kg nos tempos de 30 e 210 minutos. No entanto, uma diminuição significativa da glicemia foi observada em 30 min de (37 e 41%) para as doses de 5 e 15 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle hiperglicêmico. Ao avaliar a resposta da glicemia após a sobrecarga de glicose (210 min) a redução da glicemia foi de 18,6 e 21,1 % para as doses de 5 e 15 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle hiperglicêmico. Com estes resultados podemos concluir que o efeito anti-hiperglicêmico é independente da dose para o análogo QC2 puro.

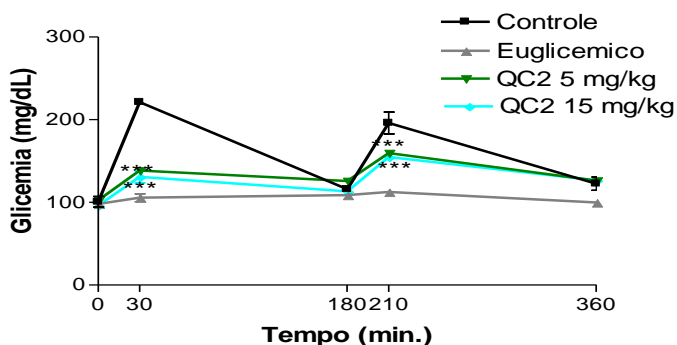


Figura 23. Efeito da chalcona QC2 nas concentrações 5 e 15 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  D.P. (n=5). QC2 5 mg foi significante \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiperglicêmico. QC2 15 mg foi significante \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiperglicêmico.

O análogo QC10, nas doses de 5 e 15 mg/kg reduz a glicemia 28,6 e 42,8 % aos 30 min, respectivamente, em relação ao controle hiperglicêmico. Este resultado possivelmente está relacionado a um efeito anti-hiperglicêmico dose-dependente. No entanto, após a sobrecarga de glicose (210 min), foi observada uma redução da glicemia em torno de 22,2 e 15,4 % nas doses de 5 e 15 mg/kg, respectivamente,

em relação ao controle hiperglicêmico (figura 24). Os resultados obtidos para a coleta de 210 min são estatisticamente iguais ( $p>0,05$ ).

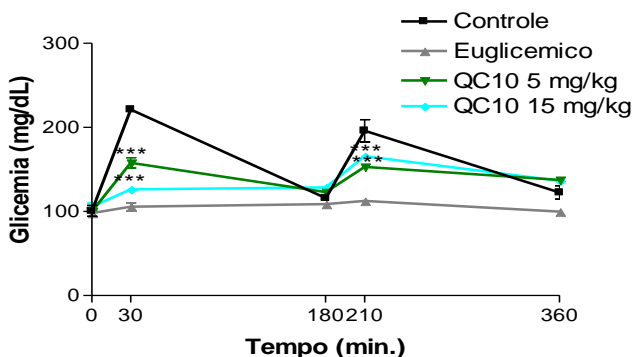


Figura 24. Efeito da chalcona QC10 nas concentrações 5 e 15 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  D.P. (n=5). QC10 5 mg foi significativa \*\*\* $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiperglicêmico. QC10 15 mg foi significativa \*\*\* $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiperglicêmico.

A figura 25 apresenta os resultados obtidos para o grupo III, composto de ratos hiperglicêmicos tratados na dose de 5 mg/kg. Neste grupo foi avaliado o comportamento dos sistemas microparticulados Eudragit/QC2 e PLGA/QC2 frente à QC2 pura. Em ambos os sistemas foi observada uma redução do nível de glicose sérica no tempo de 30 minutos em relação ao controle hiperglicêmico, porém a redução promovida pelos sistemas foi inferior ao da chalcona pura. Este resultado pode estar associado às características de liberação das chalconas a partir dos sistemas microestruturados, sendo assim, a dose disponibilizada foi insuficiente para promover a redução da glicemia. Após a sobrecarga de glicose em 180 min o sistema Eudragit/QC2 na dose de 5 mg/kg não foi capaz de controlar a glicemia.

No entanto, o sistema PLGA/QC2, na dose de 5 mg, no tempo de 210 min, apresentou um comportamento semelhante ao dos animais tratados com a chalcona pura. Com este resultado é possível inferir que *in vivo* outros fatores estão influenciando a liberação, uma vez que nos ensaios *in vitro* este sistema apresentou uma liberação de apenas 3% em 24 horas, item 3.1.4.3.

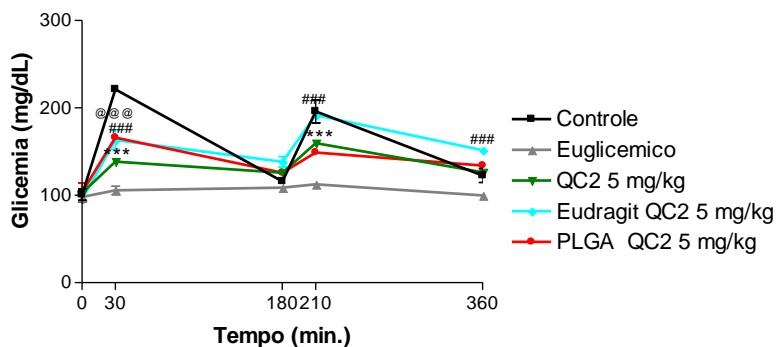


Figura 25. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit/QC2 e PLGA/QC2, grupo III, na concentração de 5 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  D.P. (n=5). QC2 5 mg foi significativa \*\*\* $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiperglicêmico. Eudragit QC2 5 mg foi significativa ### $p \leq 0,001$  em relação a QC2 pura. PLGA QC2 5 mg foi significativa @@@ $p \leq 0,001$  em relação a QC2 pura.

A figura 26 apresenta os resultados obtidos na avaliação da curva de tolerância à glicose para o grupo IV, ratos hiperglicêmicos tratados com uma dose de 15 mg/kg. O sistema Eudragit/QC2 promoveu a redução da glicemia no tempo de 30 min de 8,4 % ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo tratado com QC2 pura para a mesma dose. Ao avaliar o mesmo sistema após a sobrecarga de glicose (210 min), foi possível visualizar uma redução significativa de 10,2 % com  $p \leq 0,001$ . Este resultado corrobora com obtido na avaliação do perfil de liberação *in vitro*, o qual apresentou uma liberação da QC2 a partir do sistema microparticulado de aproximadamente 70% em 210 minutos. Sendo assim, a chalcona disponibilizada foi suficiente para promover a redução dos níveis séricos da glicose, tornando-o mais efetivo do que o composto isolado.

Para o sistema PLGA/QC2, 15 mg, a redução da glicemia foi inferior àquela obtida com o composto isolado para a mesma dose no tempo de 30 min. Após a sobrecarga de glicose (210 min) foi observada uma redução da glicemia comparável à obtida pelo composto isoladamente para a mesma dose.

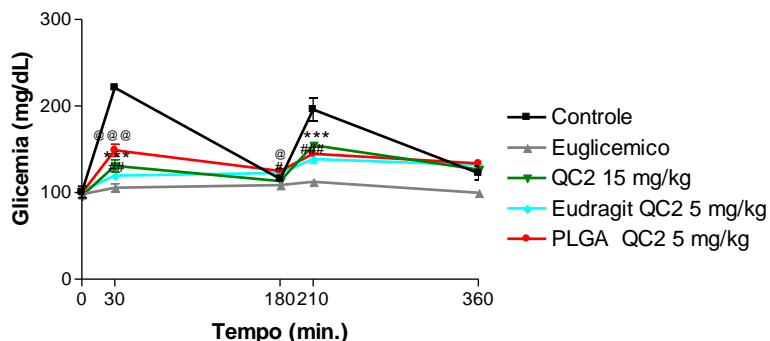


Figura 26. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit/QC2 e PLGA/QC2, grupo IV, na concentração de 15 mg/kg nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  D.P. (n=5). QC2 15 mg foi significativa \*\*\* $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiperglicêmico. Eudragit/QC2 15 mg foi significativa #  $p \leq 0,05$ , ##  $p \leq 0,01$  e ###  $p \leq 0,001$  em relação a QC2 pura. PLGA/QC2 15 mg foi significativa @  $p \leq 0,05$  e @@@  $p \leq 0,001$  em relação a QC2 pura.

As figuras 27 e 28 apresentam os resultados para os sistemas produzidos com o análogo QC10, avaliados nas concentrações 5 e 15 mg/kg, respectivamente. Para as doses avaliadas houve redução significativa ( $p \leq 0,0001$ ) em relação ao controle hiperglicêmico nos tempos 30 e 210 min. Para a concentração de 5 mg/kg o sistema Eudragit/QC10 (figura 27) apresentou uma redução significativa de 10,9 e 6,2 %, nos tempos de 30 e 210 min, respectivamente, em relação ao grupo tratado com QC10 pura. No entanto, para o sistema PLGA/QC10, a redução, em relação ao grupo tratado com QC10 pura, foi de aproximadamente 8 %, e apenas no tempo de 30 min. Este resultado pode ser atribuído às características de liberação *in vitro* deste sistema, o qual apresenta uma rápida liberação inicial seguida por um maior controle de liberação, sendo que a quantidade de QC10 liberada a partir do sistema na dose de 5 mg/kg foi insuficiente para a manutenção do nível sérico da glicose.

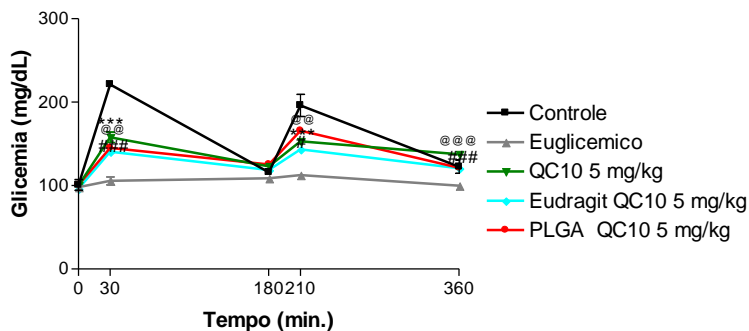


Figura 27. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit QC10 e PLGA QC10, grupo V, na concentração de 5 (mg/kg) nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  D.P. (n=5). QC10 5 mg foi significativo \*\*\* $p \leq 0,001$  em relação ao controle hiper. Eudragit QC10 5 mg foi significativo # $p \leq 0,05$  e ###  $p \leq 0,001$  em relação a QC10 pura. PLGA QC10 5 mg foi significativo @@  $p \leq 0,01$  e @@@  $p \leq 0,001$  em relação à QC10 pura.

Para a concentração de 15 mg/kg (figura 28), o sistema PLGA/QC10 não apresentou diferença estatística nos tempos avaliados em relação ao grupo tratado com QC10 puro. Ao avaliar o sistema Eudragit/QC10 foi possível observar que houve a manutenção dos níveis séricos de glicose no tempo de 30 min em relação ao grupo QC10 puro. No entanto, 30 minutos após a sobrecarga de glicose (210 min) o sistema Eudragit/QC10 proporcionou uma redução da glicemia em 18,7% em relação ao grupo tratado com QC10 puro ( $p \leq 0,001$ ).



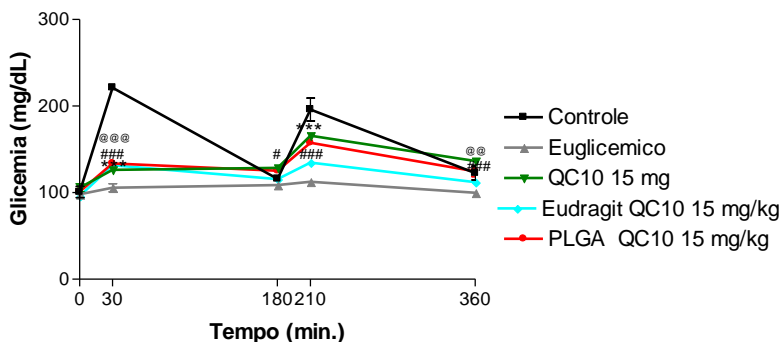


Figura 28. Efeito dos sistemas microparticulados de Eudragit/QC10 e PLGA/QC10, grupo VI, na concentração de 15 (mg/kg) nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose em ratos hiperglicêmicos. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  D.P. (n=5). Eudragit QC10 15 mg foi significativa #  $p \leq 0,05$  e ###  $p \leq 0,001$  em relação a QC10 pura. PLGA/QC10 15mg foi significativa @@  $p \leq 0,01$  e @@@  $p \leq 0,001$  em relação à QC10 pura.

Entre as formulações avaliadas, destacou-se o sistema Eudragit/QC10 que, durante o período de análise, foi capaz de manter os níveis séricos de glicose nas condições de estudo, indicando um potencial interessante na perspectiva de obter um medicamento de administração oral de liberação prolongada para o tratamento do diabetes melito.

Como perspectivas para futuros estudos, será necessário avaliar o comportamento anti-hiperglicêmico *in vivo* dos sistemas mais promissores durante um período superior a 6 horas, possivelmente 12 horas mantendo o regime de administração de sobrecarga de glicose em intervalos de 3 em 3 horas.







## CONCLUSÕES

- Um estudo de formulação visando a otimização de um sistema microparticulado de PLGA contendo a chalcona QC2 foi desenvolvido pela técnica de evaporação ou extração do solvente a partir de uma emulsão o/a. Para este estudo foi utilizado um planejamento fatorial fracionado com base em um modelo de regressão não ajustado. Este modelo foi considerado apropriado para predição e otimização de uma formulação a partir deste planejamento.
- Na caracterização destes sistemas o rendimento variou de 86,9 a 99,6 %, sendo influenciado significativamente pelos fatores volume de fase aquosa (fator D), volume de extração (fator E), bem como pelas interações entre os fatores quantidade de chalcona/volume de fase aquosa (B/D) e volume de fase orgânica/volume de fase aquosa (C/D).
- O tamanho das micropartículas foi influenciado principalmente pelos fatores volume da fase orgânica (C) e fase de extração (E), variando de 84,22 e 191,86  $\mu\text{m}$ . A polidispersão do sistema foi considerada estreita, mesmo havendo diferença estatística significativa, os baixos valores de span permitiram afirmar que todas as formulações testadas apresentam uma baixa polidispersão.
- Os valores de EE para todas as formulações variaram entre 78,5 a 97,8 %, sendo as interações mais significativas sobre esta resposta a quantidade de chalcona  $\times$  volume de fase orgânica (BC) e volume de fase orgânica  $\times$  volume de fase aquosa (CD). Estes altos valores podem ser atribuídos à característica lipofílica da chalcona QC2, que apresenta uma maior afinidade pela fase orgânica em relação à fase aquosa.
- O cálculo do teor das formulações foi de 1,7 a 5,6 mg/100 mg de micropartículas. Para esta resposta foi observado que, à medida que a concentração de chalcona aumentou e o volume de fase orgânica reduziu, obtiveram-se maiores teores de QC2 por 100 mg de micropartículas.

- A otimização do sistema microparticulado levou em conta as principais respostas - tamanho de partícula, EE e teor de chalcona, utilizando para isso a função desejabilidade, e tendo como objetivo principal a obtenção de micropartículas com o maior teor de chalcona. Dentro do campo experimental estudado, as condições ótimas foram 0,5 % de PVA, 3 mL de FO, 100 mL de FA, 100 mL de fase de extração. Foi observada uma grande similaridade entre as respostas previstas pelos modelos matemáticos e aquelas obtidas experimentalmente (variações inferiores a 10 %).
- A adição de maiores quantidades de QC2 na formulação (25, 30 e 35 mg) foi avaliada devido à influência positiva observada para o fator concentração de chalcona, mantendo-se as mesmas proporções dos demais fatores. Como resultado pôde-se notar que até a concentração de 30 mg a EE aumentou; para a concentração de 35 mg este valor diminuiu. Este resultado foi atribuído à saturação da formulação. Desta forma, a otimização do sistema microparticulado foi estabelecida com 30 mg de chalcona, 0,5 % de PVA na fase aquosa da emulsão, 3 mL de fase orgânica (300 mg de PLGA), 100 mL de fase aquosa e 100 mL de fase de extração.
- A partir da otimização do sistema microparticulado novos sistemas foram desenvolvidos incluindo o polímero Eudragit<sup>®</sup> RS 100 e a chalcona QC10 (PLGA/QC2, PLGA/QC10, Eudragit/QC2 e Eudragit/QC10).
- Os métodos desenvolvidos para a quantificação das chalconas por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições experimentais estabelecidas, mostraram-se lineares, sensíveis, específicos, precisos e exatos para a determinação das chalconas QC2 e QC10. Os sistemas cromatográficos foram validados de acordo com o preconizado pelo ICH (2005) e BRASIL (2003).
- A análise morfológica das micropartículas revelou partículas esféricas e lisas nas formulações preparadas com ambos os

polímeros, exceto o sistema PLGA/QC10, no qual foi evidenciado deposição de cristais na superfície.

- Quanto ao tamanho de partícula, os sistemas apresentaram diferenças significativas entre as formulações, de modo que as MCP desenvolvidas com PLGA foram maiores que aquelas preparadas com Eudragit® RS100. Considerando que foram mantidas as mesmas condições de preparo, atribui-se a esta diferença de tamanho a viscosidade intrínseca dos polímeros na fase orgânica.
- Na análise termogravimétrica (TG) foi observado que a chalcona QC10 livre apresenta maior estabilidade em relação à QC2. A avaliação dos sistemas microparticulados por TG a chalcona QC2 apresentou maior estabilidade térmica quando encapsulada em Eudragit® RS100. Para a chalcona QC10 ambos os polímeros conferiram a ela maior estabilidade.
- Na avaliação dos sistemas microparticulados por CED, o único sistema que apresentou evento de fusão relativo à chalcona foi o sistema Eudragit/QC2. No entanto, este comportamento não foi confirmado por DRX, sendo que este foi o único sistema que não apresentou o padrão de cristalinidade semelhante ao da chalcona QC2. Desta forma, a complementação de técnicas para a caracterização de estado sólido é necessária, uma vez que uma técnica isolada pode levar a conclusões equivocadas.
- Todos os sistemas desenvolvidos foram capazes de encapsular as chalconas com alta eficiência.
- Para o sistema PLGA/QC2 não foi evidenciado liberação da chalcona em 24 horas, o que provavelmente esteja relacionado à baixa solubilidade da QC2 no meio testado. Já no sistema PLGA/QC10 a liberação inicial pode ser atribuída à deposição de cristais de fármaco na superfície da micropartícula.
- A liberação a partir do sistema Eudragit/QC2 pode estar relacionada às características amorfas deste sistema, uma vez que a QC2 apresenta baixa solubilidade. Por outro lado, no sistema Eudragit/QC10 a acentuada liberação pode esta

relacionada à maior solubilidade deste composto no meio avaliado.

- Nos estudos *in vivo*, que avaliaram o efeito de prolongamento da ação metabólica dos sistemas microparticulados em ratos hiperglicêmicos, conclui-se que o sistema Eudragit/QC10 (15 mg/kg) apresentou o melhor comportamento de redução da glicemia nos tempos testados em relação ao composto administrado isoladamente. Sendo assim, este sistema desponta como o sistema microparticulado mais promissor para o tratamento do DM.







## REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, A. O. et al. Adherence to Oral Antidiabetic Medications in the Pediatric Population With Type 2 Diabetes: A Retrospective Database Analysis. *Clinical Therapeutics*, v. 34, n. 3, p. 712-719, 2012.
- ADIBKIA, K. et al. Piroxicam nanoparticles for ocular delivery: Physicochemical characterization and implementation in endotoxin-induced uveitis. *Journal of Drug Targeting*, v. 15, n. 6, p. 407-416, 2007.
- AHMAD, S. et al. Cardamonin, inhibits pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood. *European Journal of Pharmacology*, v. 538, n. 1-3, p. 188-194, 2006.
- ALBERTON, E. H. et al. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 171, n. 3, p. 355-362, 2008.
- ALBERTSSON, A.-C.; VARMA, I. *Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications Degradable Aliphatic Polyesters*: Springer Berlin / Heidelberg, 2002. p. 1-40. (Advances in Polymer Science).
- ALHNAN, M. A.; BASIT, A. W. Engineering polymer blend microparticles: An investigation into the influence of polymer blend distribution and interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1-2, p. 30-36, 2011.
- AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of <i>in Vitro</i> Drug Product Dissolution and <i>in Vivo</i> Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. R. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8. ed. Porto Alegre, 2007.
- ARAÚJO, J. et al. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 5, n. 4, p. 394-401, 2009.
- AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. (Pharmaceutics: The science of dosage forms design). Porto Alegre, 2005. (Tradução: ORTEGA, G.G. et al.).

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 3, p. 1364-1370, 2010.

BARCELO, A. et al. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, n. 1, p. 19-27, 2003.

BARNETT, A. et al. A review of the effects of antihyperglycaemic agents on body weight: the potential of incretin targeted therapies. *Current Medical Research and Opinion*, v. 23, n. 7, p. 1493-1507, 2007.

BARROS NETO, B. D. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: UNICAMP, 2002.

BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.

BATOVSKA, D. et al. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 1, p. 87-92, 2007.

BATYCKY, R. P. et al. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n. 12, p. 1464-1477, 1997.

BEARDSALL, K. et al. Applied physiology of glucose control. *Current Paediatrics*, v. 13, n. 7, p. 543-548, 2003.

BEHERA, B. C. et al. Characterization Of Glipizide-Loaded Polymethacrylate Microspheres Prepared By An Emulsion Solvent Evaporation Method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 1, p. 879-885, 2008.

BENNY, O. et al. Local Delivery of Poly Lactic-co-glycolic Acid Microspheres Containing Imatinib Mesylate Inhibits Intracranial Xenograft Glioma Growth. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 4, p. 1222-1231, 2009.

BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. W. PLG Microsphere Size Controls Drug Release Rate Through Several Competing Factors. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 7, p. 1055-1062, 2003.

BERNARDI, L. S. et al. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry*, v. 97, n. 2, p. 729-733, 2009.

BODMER, M. et al. Metformin, Sulfonylureas, or Other Antidiabetes Drugs and the Risk of Lactic Acidosis or Hypoglycemia A nested case-control analysis. *Diabetes Care*, v. 31, n. 11, p. 2086-2091, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE nº475, de 19 de março de 2002”. *Diário Oficial da União*. 02.06.2003.

BRASIL. Vigitel Brasil 2011: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa In: SAÚDE, M. D. (Ed.). n. Série G. Estatística e Informação em Saúde Brasília2011. p. 134.

BRITO, N., M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUSKE, J. et al. Influence of PEG in PEG–PLGA microspheres on particle properties and protein release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 81, n. 1, p. 57-63, 2012.

CAZAROLLI, L. H. et al. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 163, n. 3, p. 177-191, 2006.

CERCATO, C. et al. Systemic hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia in relation to body mass index: evaluation of a Brazilian population. *Revista do Hospital das Clínicas*, v. 59, p. 113-118, 2004.

CHEENPRACHA, S. et al. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 6, p. 1710-1714, 2006.

CHEN, H.; LANGER, R. Oral particulate delivery: status and future trends. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, n. 2–3, p. 339-350, 1998.

CHEN, J. L. Y., M. K.; CHIANG, C. H. Dichloromethane evaporative behavior during the solidifying process of ovalbumin-loaded poly (DL lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 12, n. 4, p. 291-298, 2004.

CHEN, M. et al. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 7, p. 2023-2029, 2001.

CHEN, R. M. et al. Natural PTP1B inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, n. 23, p. 3387-3390, 2002.

CHEN, W.-L. et al. Metformin regulates hepatic lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase and inducing ATGL in laying hens. *European Journal of Pharmacology*, v. 671, n. 1-3, p. 107-112, 2011.

CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, v. 172, n. 2, p. 213-226, 2005.

CHOI, Y. et al. Development of Drug-Loaded PLGA Microparticles with Different Release Patterns for Prolonged Drug Delivery. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 32, n. 3, p. 867-872, 2011.

CIARALDI, T. P. et al. Regulation of Glucose Transport and Insulin Signaling by Troglitazone or Metformin in Adipose Tissue of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes*, v. 51, n. 1, p. 30-36, 2002.

CILURZO, F. et al. Evaluation of compatibility of methacrylic copolymers by capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 76, n. 11, p. 1662-1668, 2000.

COLCA, J. R. Insulin sensitizers may prevent metabolic inflammation. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n. 2, p. 125-131, 2006.

CORRIGAN, O. I. Thermal analysis of spray dried products. *Thermochimica Acta*, v. 248, n. 0, p. 245-258, 1995.

CRUZ, L. et al. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 40, n. 5, p. 441-447, 2010.

CUN, D. et al. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 77, n. 1, p. 26-35, 2011.

CYRINO, F. Z. G. A. et al. Effects of sulfonylureas on KATP channel-dependent vasodilation. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 17, n. 2, Supplement, p. 6-10, 2003.

DA SILVA, R., L.,; VOLPATO, N., M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 2, p. 163 - 172, 2002.

DAMAZIO, R. G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 1332-1337, 2010.

DAMAZIO, R. G. et al. Nitrochalcones: Potential in vivo insulin secretagogues. *Biochimie*, v. 91, n. 11-12, p. 1493-1498, 2009.

DANG, T. D.; JOO, S. W. Preparation of tadpole-shaped calcium alginate microparticles with sphericity control. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, n. 0, p. 766-771, 2013.

DAS, S.; SURESH, P. K.; DESMUKH, R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 6, n. 2, p. 318-323, 2010.

DASHORA, K.; SARAF, S.; SARAF, S. Effect of processing variables and in-vitro study of microparticulate system of nimesulide. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 555-562, 2007.

DE CARVALHO TAVARES, L. et al. Quinolinyln and quinolinyln N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 4448-4456, 2011.

DE SOUSA, E. et al. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 5, p. 829-832, 2004.

DELMULLE, L. et al. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine*, v. 13, n. 9-10, p. 732-734, 2006.

DERRINGER, G.; SUICH, R. SIMULTANEOUS-OPTIMIZATION OF SEVERAL RESPONSE VARIABLES. *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DESHPANDE, A. M. et al. Synthesis and screening of a combinatorial library of naphthalene substituted chalcones: inhibitors of leukotriene B<sub>4</sub>. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 6, p. 1237-1240, 1999.

DESIGN-EXPERT 8 MANUAL. Disponível em [http://www.statease.com/dx8\\_man.html](http://www.statease.com/dx8_man.html). Acesso em 02/08/2012.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIMMOCK, J. R. et al. Bioactivities of chalcones. *Current Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 12, p. 1125-1149, 1999.

DOMÍNGUEZ, J. N. et al. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *Il Farmaco*, v. 60, n. 4, p. 307-311, 2005.

DUNNE, M.; CORRIGAN, O. I.; RAMTOOLA, Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, v. 21, n. 16, p. 1659-1668, 2000.

DURRER, C. et al. Mucoadhesion of Latexes. I. Analytical Methods and Kinetic Studies. *Pharmaceutical Research*, v. 11, n. 5, p. 674-679, 1994.

EDLUND, U.; ALBERTSSON, A. Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery

Degradable Aliphatic Polyesters: Springer Berlin / Heidelberg, 2002. p. 67-112. (Advances in Polymer Science).

ENOKI, T. et al. Antidiabetic Activities of Chalcones Isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 15, p. 6013-6017, 2007.

ERKENS, J. A. et al. Cardiovascular risk factors and diseases precede oral hypoglycaemic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 55, n. 4, p. 345-349, 2002.



ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, n. 1–2, p. 329-334, 2002.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J. P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, n. 4, p. 355-366, 2002.

FERNÁNDEZ-CARBALLIDO, A. et al. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: Effect of Labrafil addition on release in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 279, n. 1–2, p. 33-41, 2004.

FRANK, A.; RATH, S. K.; VENKATRAMAN, S. S. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition. *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 2, p. 333-344, 2005.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, n. 1–2, p. 1-18, 2004a.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004b.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.

GABBAY, M.; CESARINI, P. R.; DIB, S. A. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. *Jornal de Pediatria*, v. 79, p. 201-208, 2003.

GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N.-O.; LUNDSTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. *Journal of Chemometrics*, v. 16, n. 3, p. 141-160, 2002.

GAIGNAUX, A. et al. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 437, n. 1–2, p. 20-28, 2012.

GALIA, E. et al. Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting In Vivo Performance of Class I and II Drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 5, p. 698-705, 1998.

GERWIN, N.; HOPS, C.; LUCKE, A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 2, p. 226-242, 2006.

GHEBRE-SELLANIE, I. *Multiparticulate oral drug delivery*. New York: Marcel Dekker, 1994. 480p.)

GIBSON, P. R. et al. Comparison of the efficacy and safety of Eudragit-L-coated mesalazine tablets with ethylcellulose-coated mesalazine tablets in patients with mild to moderately active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 23, n. 7, p. 1017-1026, 2006.

GITEAU, A. et al. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, n. 1-2, p. 14-26, 2008.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, v. 17, n. 2, p. 103-114, 1996.

GUSE, C. et al. Programmable implants—From pulsatile to controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 314, n. 2, p. 161-169, 2006.

HAZNEDAR, S.; DORTUNÇ, B. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 269, n. 1, p. 131-140, 2004.

HERENCIA, F. et al. 4-dimethylamino-3',4'-dimethoxychalcone downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 30, n. 1, p. 43-50, 2001.

HESLINGA, M. J.; MASTRIA, E. M.; ENIOLA-ADEFESO, O. Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, v. 138, n. 3, p. 235-242, 2009.

HOLGADO, M. A. et al. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing: Effects on drug loading and release

properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 358, n. 1–2, p. 27–35, 2008.

HOMBREIRO-PÉREZ, M. et al. Non-degradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling. *Journal of Controlled Release*, v. 88, n. 3, p. 413–428, 2003.

HOUCHIN, M. L.; TOPP, E. M. Physical properties of PLGA films during polymer degradation. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, n. 5, p. 2848–2854, 2009.

HUANG, Y.-Y.; CHUNG, T.-W.; TZENG, T.-W. Drug release from PLA/PEG microparticulates. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 156, n. 1, p. 9–15, 1997.

ICH. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1). London, 2005.

ISRAF, D. A. et al. Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF- $\kappa$ B nuclear translocation and I $\kappa$ -B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. *Molecular Immunology*, v. 44, n. 5, p. 673–679, 2007.

JAFARI NEJAD, S. et al. Fractional factorial design for the optimization of hydrothermal synthesis of lanthanum oxide nanoparticles under supercritical water condition. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, n. 3, p. 292–297, 2010.

JANSSENS, S. et al. Influence of polyethylene glycol chain length on compatibility and release characteristics of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethylene glycol/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 35, n. 3, p. 203–210, 2008.

JAVADZADEH, Y. et al. Preparation and physicochemical characterization of naproxen–PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 81, n. 2, p. 498–502, 2010.

JAVOT, L. et al. Encapsulation of low molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. *Journal of Controlled Release*, v. 139, n. 1, p. 8–14, 2009.

JEFFERY, H.; DAVIS, S. S.; O'HAGAN, D. T. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 77, n. 2-3, p. 169-175, 1991.

JELVEHGARI, M. et al. Effects of process variables on micromeritic properties and drug release of non-degradable microparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 1, n. 1, p. 18-26, 2011.

JERMENDY, G. Optimal insulin treatment for patients with type 2 diabetes: Basal or prandial insulin supplementation? *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 74, n. 2, Supplement, p. S20-S29, 2006.

JORGE, A. P. et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, v. 149, n. 2-3, p. 89-96, 2004.

KAMEI, R. et al. 2'-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sciences*, v. 73, n. 16, p. 2091-2099, 2003.

KANG, J.; SCHWENDEMAN, S. P. Pore Closing and Opening in Biodegradable Polymers and Their Effect on the Controlled Release of Proteins. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, n. 1, p. 104-118, 2006.

KARTHIKEYAN, M. S.; HOLLA, B. S.; KUMARI, N. S. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxy pyrazolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 1, p. 30-36, 2007.

KATOU, H.; WANDREY, A. J.; GANDER, B. Kinetics of solvent extraction/evaporation process for PLGA microparticle fabrication. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, n. 1, p. 45-53, 2008.

KAUR, K. et al. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 8, p. 3245-3264, 2010.

KEMALA, T.; BUDIANTO, E.; SOEGIYONO, B. Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 103-108, 2012.

KENDALL, R. A. et al. Fabrication and in vivo evaluation of highly pH-responsive acrylic microparticles for targeted gastrointestinal delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 3–4, p. 284-290, 2009.

KIAT, T. S. et al. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 12, p. 3337-3340, 2006.

KIM, B. Y. et al. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. *J Control Release*, v. 102, n. 3, p. 525-538, 2005.

KINCL, M.; TURK, S.; VREČER, F. Application of experimental design methodology in development and optimization of drug release method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 291, n. 1–2, p. 39-49, 2005.

KLOSE, D.; DELPLACE, C.; SIEPMANN, J. Unintended potential impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 404, n. 1-2, p. 75-82, 2011.

KLOSE, D. et al. Fenofibrate-loaded PLGA microparticles: Effects on ischemic stroke. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 1, p. 43-52, 2009.

KLOSE, D. et al. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 314, n. 2, p. 198-206, 2006.

KLOSE, D. et al. Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the “microparticle:bulk fluid” ratio. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 383, n. 1-2, p. 123-131, 2010.

KOCKISCH, S. et al. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an in vitro evaluation of mucoadhesive potential. *J Pharm Sci*, v. 92, n. 8, p. 1614-1623, 2003.

KOCKISCH, S. et al. In situ evaluation of drug-loaded microspheres on a mucosal surface under dynamic test conditions. *Int J Pharm*, v. 276, n. 1-2, p. 51-58, 2004.

KRAUSOVA, L. et al. Metformin suppresses pregnane X receptor (PXR)-regulated transactivation of CYP3A4 gene. *Biochemical Pharmacology*, v. 82, n. 11, p. 1771-1780, 2011.

KUMAR, S. et al. Antidiabetic potential of *Phyllanthus reticulatus* in alloxan-induced diabetic mice. *Fitoterapia*, v. 79, n. 1, p. 21-23, 2008.

LAHTCHEV, K. L. et al. Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 10, p. 2220-2228, 2008.

LAWRENCE, N. J. et al. Effects of  $\alpha$ -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 22, p. 5844-5848, 2006.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIU, X.; GO, M.-L. Antiproliferative properties of piperidinylchalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 1, p. 153-163, 2006.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, v. 3, n. 3, p. 1377-1397, 2011.

MANDAL, T. K. Evaluation of a Novel Phase Separation Technique for the Encapsulation of Water-Soluble Drugs in Biodegradable Polymer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 7, p. 623-629, 1998.

MAO, S. et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 334, n. 1-2, p. 137-148, 2007.

MARQUES, R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analytica*, v. 1, p. 48 - 51, 2002.

MORENO PÉREZ, O. et al. Glinidas. Revisión de su uso terapéutico en la diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*, v. 55, Supplement 2, n. 0, p. 26-33, 2008.

MUKHERJEE, B. et al. A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on in vitro skin permeation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, n. 3, p. 475-483, 2005.

MUNDARGI, R. C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008.

NATHAN, D. M. et al. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. *Clinical Diabetes*, v. 27, n. 1, p. 4-16, 2009.

NESSEEM, D. I.; EID, S. F.; EL-HOUSENY, S. S. Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sciences*, v. 89, n. 13-14, p. 430-438, 2011.

NIELSEN, S. F. et al. Antibacterial chalcones—bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 11, p. 3047-3054, 2004.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 28, n. 1, p. 25-42, 1997.

OMARI, D. M. et al. Lactic acid-induced modifications in films of Eudragit RL and RS aqueous dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, n. 1-2, p. 85-96, 2004.

OTA, S. et al. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 388, n. 2, p. 311-316, 2009.

PALLARDO SÁNCHEZ, L. F. Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición*, v. 55, Supplement 2, n. 0, p. 17-25, 2008.

PARK, T. G.; LU, W.; CROTTS, G. Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in

protein encapsulated poly (d,l-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 33, n. 2, p. 211-222, 1995.

PASSERINI, N. et al. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 318, n. 1-2, p. 92-102, 2006.

PEDRIANES MARTÍN, P. B.; DE PABLOS VELASCO, P. L. Seguridad y tolerabilidad de los antidiabéticos orales en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Clínica*, v. 135, Supplement 2, n. 0, p. 20-26, 2010.

PEREIRA, D. F. Caracterização dos efeitos da *Ilex paraguariensis* e de compostos naturais e análogos na atividade anti-diabética. (2011). 186 p f. (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2011.

PERUMAL, D. Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit® RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 218, n. 1-2, p. 1-11, 2001.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; PUGLISI, G. Ocular tolerability of Eudragit RS100® and RL100® nanosuspensions as carriers for ophthalmic controlled drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 91, n. 12, p. 2636-2641, 2002.

RANG, H. P. et al. O pâncreas endócrino e o controle da glicemia. In. *Farmacologia 5*. Rio de Janeiro, 2003. Cap.25. p. 904.

RAVIVARAPU, H. B.; BURTON, K.; DELUCA, P. P. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 2, p. 263-270, 2000.

RIEKES, M. K. et al. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 5, p. 962-968, 2011.

ROSAK, C. The pathophysiologic basis of efficacy and clinical experience with the new oral antidiabetic agents. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 16, n. 1, p. 123-132, 2002.



SANSDRAP, P.; MOËS, A. J. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 98, n. 1-3, p. 157-164, 1993.

SATO, M. et al. Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 6, n. 4, p. 227-231, 1996.

SATYANARAYANA, M. et al. Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 5, p. 883-889, 2004.

SBD. Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus. Diretrizes da SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. In: DIABETES, S. B. D. (Ed.)2007.

SBD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Revista da SDB, Abril 2012, v 19, n. 2.

<http://www.diabetes.org.br/attachments/revistas2012/revista-diabetes-vol19-n2/>

Acesso em 05/06/2012.

SBH. IV Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. . Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão, v. 5, 2002.

SEO, W. D. et al. Sulfonamide chalcone as a new class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 24, p. 5514-5516, 2005.

SEYEDNEJAD, H. et al. Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*, v. 152, n. 1, p. 168-176, 2011.

SIEGEL, S. J. et al. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 64, n. 3, p. 287-293, 2006.

SIEPMANN, J. et al. How Autocatalysis Accelerates Drug Release from PLGA-Based Microparticles: A Quantitative Treatment. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 4, p. 2312-2319, 2005.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, p. 1-20, 2003.

SIMMONS, R. K.; UNWIN, N.; GRIFFIN, S. J. International Diabetes Federation: An update of the evidence concerning the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 87, n. 2, p. 143-149, 2010.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: UFSC, E. D. U. E. D. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, 2004. Cap.13. p. 289-326.

STEVANOVIC, M.; USKOKOVIC, D. Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Current Nanoscience*, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2009.

STULZER, H. K. Desenvolvimento e avaliação de sistemas microparticulados de liberação modificada a base de quitosana contendo o antiviral aciclovir. (2008). 268 f. (Doutor) - Departamento de ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, florianópolis, 2008.

THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 52, n. 2, p. 117-126, 2001.

THOTE, A. J. et al. Reduction in the Initial-Burst Release by Surface Crosslinking of PLGA Microparticles Containing Hydrophilic or Hydrophobic Drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 31, n. 1, p. 43-57, 2005.

TOMAR, V. et al. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 2, p. 745-751, 2010.

TRAPANI, A. et al. Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, n. 1, p. 64-74, 2007.

TRIVEDI, J. C. et al. Improved and rapid synthesis of new coumarinyl chalcone derivatives and their antiviral activity. *Tetrahedron Letters*, v. 48, n. 48, p. 8472-8474, 2007.

VALLA, A. et al. New syntheses and potential antimalarial activities of new 'retinoid-like chalcones'. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 1, p. 142-146, 2006.

VANDERWEELE, D. A. Insulin is a prandial satiety hormone. *Physiology & Behavior*, v. 56, n. 3, p. 619-622, 1994.

VASCONCELLOS, F. C.; GOULART, G. A. S.; BEPPU, M. M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. *Powder Technology*, v. 205, n. 1-3, p. 65-70, 2011.

VASQUES, A. C. J. et al. Influência do excesso de peso corporal e da adiposidade central na glicemia e no perfil lipídico de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, p. 1516-1521, 2007.

VENKAT NARAYAN, K. M. et al. Diabetes — a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 50, Supplement 2, n. 0, p. S77-S84, 2000.

VERMA, R. K.; GARG, S. Compatibility studies between isosorbide mononitrate and selected excipients used in the development of extended release formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, n. 3, p. 449-458, 2004.

VERT, M. et al. Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers? *Journal of Controlled Release*, v. 53, n. 1-3, p. 85-92, 1998.

VIJAYA BHASKAR REDDY, M. et al. Structure-activity relationships of chalcone analogs as potential inhibitors of ADP- and collagen-induced platelet aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 24, p. 7711-7719, 2011.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*, v. 20, p. 51-64, 2010.

VILOS, C.; VELASQUEZ, L. A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 9, 2012.

VOGEL, S. et al. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 6, p. 2206-2213, 2010.

WANG, H. T. et al. Degradation of poly(ester) microspheres. *Biomaterials*, v. 11, n. 9, p. 679-685, 1990.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Encapsulation of 5-aminosalicylic acid into Eudragit RS microspheres and modulation of their release characteristics by use of surfactants. *Journal of Controlled Release*, v. 16, n. 3, p. 311-318, 1991.

WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 94, n. 3, p. 311-321, 2011.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, n. 2, p. 298-327, 2008.

YADAV, V. R. et al. The role of chalcones in suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 3, p. 295-309, 2011.

YANG, C. et al. PLGA and PHBV Microsphere Formulations and Solid-State Characterization: Possible Implications for Local Delivery of Fusidic Acid for the Treatment and Prevention of Orthopaedic Infections. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 7, p. 1644-1656, 2009.

YEO, Y.; PARK, K. N. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research*, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2004.

ZANATTA, L. et al. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 1, p. 151-155, 2007.

ZANATTA, L. et al. Insulinomimetic Effect of Kaempferol 3-Neohesperidoside on the Rat Soleus Muscle. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 4, p. 532-535, 2008.

ZHANG, H. et al. Bupivacaine-loaded biodegradable poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres: I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix and modelling of drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 351, n. 1-2, p. 244-249, 2008.

ZHAO, L.-M. et al. Synthesis and evaluation of antiplatelet activity of trihydroxychalcone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 22, p. 5027-5029, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: PORTO ALEGRE: EDITORA DA UFRGS, F. E. U. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 2004. Cap.Cap. 23. . p. 577-614.